



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PERFIS DE ÁCIDOS GORDOS DO MÚSCULO E CÉREBRO DE RATOS WISTAR
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO NÍVEIS CRESCENTES DE CONSERVA DE
SARDINHA

SAMUEL DA COSTA MIGUÉIS

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutor Pedro Orlando Rodrigues
Doutor José António Mestre Prates
Engenheira Maria Leonor de Almeida Nunes
Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

ORIENTADOR

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

CO-ORIENTADOR

Doutor José António Mestre Prates

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

PERFIS DE ÁCIDOS GORDOS DO MÚSCULO E CÉREBRO DE RATOS WISTAR
ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO NÍVEIS CRESCENTES DE CONSERVA DE
SARDINHA

SAMUEL DA COSTA MIGUÉIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JURI

Doutor Pedro Orlando Rodrigues
Doutor José António Mestre Prates
Engenheira Maria Leonor de Almeida Nunes
Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

ORIENTADOR

Doutora Narcisa Maria Mestre Bandarra

CO-ORIENTADOR

Doutor José António Mestre Prates

2010

LISBOA

Agradecimentos

Agradeço à minha esposa, Catarina, pelo apoio moral e pela compreensão da ausência mesmo estando presente.

Agradeço em particular à Doutora Narcisa Bandarra pela orientação de toda esta dissertação e pelo “rumo” em alturas de pouco “Norte”.

Ao Professor Doutor Mestre Prates pelo esclarecimento, sempre claro, sintético e explícito, das dúvidas que surgiram no decorrer desta dissertação.

Ao meu grande amigo, e cunhado, Professor José Félix Afonso Póvoa pela disponibilidade em explicar e demonstrar como fazer o tratamento estatístico desta dissertação.

Um, agradecimento, muito especial a toda a equipa do laboratório de lípidos pela disponibilidade de tempo que sempre prescindiram: Cristina Ramos, Júlia, Maria do Castelo e Joana.

E por fim a todos os que, directa ou indirectamente, contribuíram para a término desta dissertação.

Congressos científicos onde foram apresentados alguns dos resultados experimentais

7th EuroFeedLipids – *Effect of graded levels of dietary n-3/n-6 PUFA on blood and brain lipids* (N. M. Bandarra, S. Migueis, C. Ramos, I. Batista, M. L. Nunes, S.V. Martins, P. A. Lopes, C. M., M. L. Andrade, J. A. Prates, P. Rodrigues). Comunicação Oral.

Resumo:

Título: Perfis de ácidos gordos do músculo e cérebro de ratos Wistar alimentados com dietas contendo níveis crescentes de conserva de sardinha

Resumo:

A sociedade ocidental actual tem uma dieta com uma razão n-6/n-3 elevada, 15-20:1. Vários estudos confirmam a necessidade de alterar essa razão para 1-2:1, devido às patologias associadas a este tipo de dieta. A alteração dessa razão n-6/n-3 pode ser conseguida através da introdução, nas dietas da sociedade ocidental, de alimentos funcionais ricos em DHA e EPA. Estes AG têm evidenciado ter uma acção importante na prevenção de doenças cardiovasculares e de doenças neuro-degenerativas.

O licopeno, antioxidante maioritário do tomate, tem revelado em muitos estudos um poder antioxidante tal que pode conferir capacidades cardioprotectoras, anti-inflamatórias, antimutagénicas e anticarcinogénicas.

Este estudo demonstrou que a incorporação de AG no cérebro de ratos wistar é influenciada pela interação da sardinha, peixe gordo, com elevadas concentrações de DHA (22:6n-3) e EPA (20:5n-3), com o tomate, vegetal com altas concentrações de licopeno.

Verificou-se também que dietas com concentrações crescentes de DHA aumentam a concentração, deste AG, no tecido muscular e eritrócitos, ao contrário do tecido cerebral, em que o aumento parece ser diminuto e com um “plateau” nos 13% de DHA (w/w).

Utilizando o índice n-3, proposto por William S. Harris e Clemen von Schacky, duas latas de sardinha por dia conferem um nível desejável de protecção contra doenças cardiovasculares em humanos.

Palavras-chave: Sardinha, tomate, DHA, EPA, cérebro, músculo, eritrócitos, índice n-3.

Abstract

Title: Fatty Acids Profile of the muscle and brain of Wistar rats feed with diets containing graded levels of canned sardines

Abstract:

The current occidental population has a diet with a high n-6/n-3 ratio, 15-20:1. Several studies confirm the need of changing such ratio to 1-2:1, due to the pathologies connected with such kind of diets. The change of the ratio n-6/n-3 may be reached through the insertion of functional food with DHA and EPA. These fatty acids (FA) have proved an important role in preventing cardiovascular (CVD) and neurodegenerative diseases.

Lycopene, tomato majority antioxidant, has evidenced in several studies to have an antioxidant which may provide protection to the cardiovascular system, as well as anti-inflammatory, anti-mutagenic and anti-carcinogenic properties.

This study revealed that fatty acids incorporation on Wistar rats brains is influenced by the interaction of sardine, fat fish rich in DHA (22:6n-3) and EPA (20:5n-3), and with tomato, with high lycopene concentration.

Diets with graded concentration of DHA leads to the increase of such FA on muscle and red blood cells, contrarily to brain tissue, where such increase seems to be low and with a plateau on 13% of DHA (w/w).

Using the n-3 index proposed by William S. Harris and Clemen von Schacky, two canned sardines on a daily basis provides a desirable level of CVD protection in human.

Key words: Sardine, tomato, DHA, EPA, brain, muscle, RBC, n-3 index.

Índice Geral

| | |
|---|-------------|
| AGRADECIMENTOS | II |
| CONGRESSOS CIENTÍFICOS ONDE FORAM APRESENTADOS ALGUNS DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS | III |
| RESUMO: | IV |
| ABSTRACT | V |
| ÍNDICE GERAL..... | VI |
| ÍNDICE REMESSIVO..... | VIII |
| ABREVIATURAS | X |
| ÍNDICE TABELAS | XI |
| ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES..... | XII |
| OBJECTIVOS: | 1 |
| 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 2 |
| 1.1 HÁBITOS ALIMENTARES NO SÉCULO XXI CONDICIONAM A RAZÃO N-6/N-3 | 2 |
| 1.2 - SARDINHA EM CONSERVA | 3 |
| 1.2.1 – <i>História</i> | 3 |
| 1.2.2 – <i>Sardinha como alimento funcional</i> | 4 |
| 1.2.3 - <i>O Tomate como alimento funcional</i> | 6 |
| 1.3 - DESAFIOS PARA A SEGURANÇA ALIMENTAR DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS? | 8 |
| 1.4 - OS LÍPIDOS | 8 |
| 1.3.1 - <i>Ácidos Gordos como elementos constituintes dos lípidos</i> | 11 |
| 1.3.2 – <i>Metabolismo lipídico</i> | 12 |
| 1.3.3 – <i>Ácidos Gordos Essenciais</i> | 15 |
| 1.3.4 – <i>Ácidos gordos como precursores de eicosanóides e docosanóides</i> | 15 |
| 1.5 – ESTRUTURA DAS MEMBRANAS CELULARES..... | 16 |
| 1.6 – O SISTEMA NERVOSO HUMANO E A IMPORTÂNCIA DO ÓLEO DE PEIXE | 19 |
| 1.7 – O MÚSCULO E A IMPORTÂNCIA DO ÓLEO DE PEIXE..... | 22 |
| 1.8 – O SANGUE COMO INDICADOR DE RISCO DE DOENÇAS CARDIOVASCULAR | 22 |
| 2 - TRABALHO EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 2.1 – DIETAS | 23 |
| 2.2 – POPULAÇÃO ESTUDADA | 24 |
| 2.3 – AS AMOSTRAS | 24 |
| 2.4 – ANÁLISES BIOQUÍMICAS | 25 |
| 2.4.1 – <i>Determinação do Perfil de Ácidos Gordos</i> | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.2 – <i>Composição química da sardinha em conserva das dietas</i> | 26 |
| 2.5 – TRATAMENTO ESTATÍSTICO | 28 |
| 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 3.1 PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS NAS DIETAS | 29 |
| 3.2 EVOLUÇÃO DOS PESOS DOS RATOS | 30 |
| 3.3 PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS NOS ERITRÓCITOS | 30 |
| 3.4 PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO | 35 |
| 3.5 PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS NO CÉREBRO | 40 |
| 4 – CONCLUSÃO | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 47 |
| ANEXOS | 54 |
| ANEXO 1 – OUTLIERS..... | 55 |
| 1. <i>Cérebro</i> | 55 |
| 2. <i>Músculo</i> | 58 |

Índice Remessivo

A

| | |
|-------------------------------|----|
| absorção | 12 |
| Absorção..... | 14 |
| ácido alfa-linolénico | 15 |
| ácido linoleico..... | 15 |
| Ácidos Gordos Essenciais..... | 15 |
| alimento funcional..... | 5 |
| alimentos especiais | 5 |
| apertização | 3 |
| axónio | 20 |

C

| | |
|--------------------------------------|--------|
| carotenóides..... | 6 |
| cérebro | 20 |
| ciclopentanoperihidrofenantreno..... | 10, 18 |
| colesterol..... | 18 |
| corpo celular..... | 20 |

D

| | |
|-------------------|----|
| dendrites | 20 |
| DHA..... | 4 |
| digestão | 12 |
| docosanóides..... | 16 |

E

| | |
|---------------------|----|
| EFA..... | 4 |
| eicosanóides | 15 |
| Emulsificação..... | 13 |
| EPA | 4 |
| Esfingolípido | 17 |
| esfingolípidos..... | 10 |
| esfingosina..... | 17 |

F

| | |
|-----------------------|----|
| Fibras Nervosas | 20 |
| Food Efficiency | 30 |

G

| | |
|---------------------------|----|
| Galactocerebrosido | 17 |
| Ganho Médio Diário | 30 |
| glicerofosfolípido..... | 17 |
| glicerofosfolípidos | 9 |

H

| | |
|----------------------|----|
| hidrocarboneto | 11 |
| Hidrólise | 13 |

I

| | |
|-----------|---|
| IFIC..... | 4 |
|-----------|---|

L

| | |
|-------------------|-------------------------------------|
| Leucotrienos..... | 16 |
| licopeno..... | iv, 4, 6, 7, 11, 23, 31, 34, 39, 45 |

M

| | |
|-----------------|----|
| membranas | 16 |
| micelas..... | 13 |
| MUFA..... | 11 |

N

| | |
|-------------------------|------|
| Neuroglia | 20 |
| Neurónio | 20 |
| nódulos de Ranvier..... | 20 |
| nutracêutico | 5 |
| nutrição | 4, 5 |
| nutrição óptima..... | 4 |

O

| | |
|--------------------|----|
| omega-3 index..... | 23 |
|--------------------|----|

P

| | |
|---------------------------|----|
| Paleolítico..... | 2 |
| perigos nutricionais..... | 8 |
| Prostaglandinas | 16 |

| | | | |
|---------------------------|----|--------------------------------------|------------------------|
| PUFA | 11 | <u>suplementos alimentares</u> | 6 |
| Q | | T | |
| quilomicrons | 14 | target function | 5 |
| S | | tomate | iv, 1, 4, 6, 7, 23, 46 |
| segurança alimentar | 8 | triacilglicerol | 11 |
| SFA | 11 | Tromboxanos | 16 |

Abreviaturas

AA – Ácido Araquidónico

AG – Ácido(s) Gordo(s) “Fatty Acids”

ALA – α - Linolenic Acid (Ácido α -linolénico)

DHA – Ácido Docosahexaenóico (22:6n-3)

DP – Desvio Padrão

EFA – Ácidos gordos essenciais

EPA – Ácido Eicosapentaenóico (20:5n-3)

FABP – Fatty Acid Binding Protein

FID – Flame Ionization Detector

g – Força g

LA – Ácido linoleico

LCFA – Long Chain Fatty Acid – Ácidos gordos de cadeia longa

LCPUFA – Ácidos gordos poli-insaturados de cadeia longa (Long Chain Poly-Unsaturated Fatty Acids) (inclui: DHA, EPA e AA)

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados

PUFA – Ácidos gordos polinsaturados

RD – Razão de Deposição

rpm – rotações por minuto

SFA – Ácido Gordo Saturado (Saturated fatty acids)

UFA – Ácido Gordo Insaturado (Unsaturated fatty acids)

Índice Tabelas

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – VALORES DE AG (MG/100G) DA SARDINHA E SALMÃO EM 3 CONDIÇÕES DISTINTAS: FRESCA, GRELHADA E EM CONSERVA E DA TRUTA CRUA | 3 |
| TABELA 2 – COMPOSIÇÃO DOS MUFA E PUFA DE SARDINHA SEGUNDO THE GEORGE MATELIAN FOUNDATION | 4 |
| TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO DE LICOPENO (MG/100G) EM VÁRIOS ALIMENTOS | 7 |
| TABELA 4 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA SARDINHA EM CONSERVA UTILIZADA NA FORMULAÇÃO DAS VÁRIAS DIETAS. | 23 |
| TABELA 5 – TABELA DE INGREDIENTES DAS 6 DIETAS FORMULADAS EM % (W/W)..... | 24 |
| TABELA 6 – COMPOSIÇÃO, EM % DOS AG TOTAIS, DOS ÁCIDOS GORDOS DAS DIFERENTES DIETAS: S, SL, F1, F2, F1L E F2L. | 29 |
| TABELA 7 – VALORES DO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA DO TESTE ONE-WAY- ANOVA, PARA AS 6 VARIÁVEIS ANALISADAS | 30 |
| TABELA 8 - MÉDIA DAS RAZÕES DE DEPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS PUFA NOS ERITRÓCITOS COM RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO. | 32 |
| TABELA 9 – PERCENTAGEM DE ÁCIDOS GORDOS, E RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO, NOS ERITRÓCITOS DE RATINHOS ALIMENTADOS COM 6 TIPOS DE RAÇÕES DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SARDINHA (ÓLEO DE SARDINHA) COM E SEM TOMATE..... | 34 |
| TABELA 10 - MÉDIA DAS RAZÕES DE DEPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS PUFA NO MÚSCULO COM RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO | 36 |
| TABELA 11 - ANÁLISE DE REGRESSÃO, LINEAR OU QUADRÁTICA, DO FACTOR ÓLEO DE SARDINHA NA DEPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO..... | 37 |
| TABELA 12 - ANÁLISE DE REGRESSÃO, LINEAR OU QUADRÁTICA, DO FACTOR TOMATE NA DEPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO | 38 |
| TABELA 13 - DISPOSIÇÃO DA PERCENTAGEM DOS ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO DE RATINHOS ALIMENTADOS COM 6 TIPOS DE RAÇÕES DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SARDINHA COM E SEM TOMATE. | 39 |
| TABELA 14 – MÉDIA DO TOTAL DE AG QUANTIFICADOS NOS VÁRIOS GRUPOS, COM RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO. | 40 |
| TABELA 15 - MÉDIA DAS RAZÕES DE DEPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS PUFA NO CÉREBRO COM RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO..... | 42 |
| TABELA 16 – ANÁLISE DE REGRESSÃO, LINEAR OU QUADRÁTICA, DO FACTOR ÓLEO DE SARDINHA NA DEPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO CÉREBRO. | 43 |
| TABELA 17 - – ANÁLISE DE REGRESSÃO, LINEAR OU QUADRÁTICA, DO FACTOR TOMATE NA DEPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO CÉREBRO. | 43 |
| TABELA 18 – RESUMO DOS VALORES P DAS ANÁLISES DE REGRESSÃO DOS DOIS FACTORES ÓLEO SARDINHA E TOMATE NO CÉREBRO .. | 44 |
| TABELA 19 - DISPOSIÇÃO DA PERCENTAGEM DOS ÁCIDOS GORDOS NO CÉREBRO DE RATINHOS ALIMENTADOS COM 6 TIPOS DE RAÇÕES DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE SARDINHA (ÓLEO DE SARDINHA) COM E SEM TOMATE | 45 |

Índice de Ilustrações

| | |
|--|----|
| ILUSTRAÇÃO 1 – ESTRUTURA DOS CAROTENÓIDES MAIS COMUNS, À ESQUERDA. <i>IN</i> (WILDMAN, 2001) | 7 |
| ILUSTRAÇÃO 2 – GLICEROFOSFOLÍPIDOS (NELSON & COX, 2000)..... | 10 |
| ILUSTRAÇÃO 3 – MOLÉCULA DE TRIACILGLICEROL: 3 ÁCIDOS GORDOS LIGADOS A UMA MOLÉCULA DE GLICEROL (ROSA)..... | 11 |
| ILUSTRAÇÃO 4 – ÁCIDO ALFA-LINOLÉNICO (18:3N-3) <i>IN</i> (BEST)..... | 12 |
| ILUSTRAÇÃO 5 – COMPARAÇÃO DA DISPOSIÇÃO ENTRE AG SATURADOS E MUFA/PUFA (NELSON & COX, 2000)..... | 12 |
| ILUSTRAÇÃO 6 – DIFERENÇAS ENTRE A CONFIGURAÇÃO CIS E TRANS. <i>IN</i> (BEST, 1990) | 13 |
| ILUSTRAÇÃO 7 – REPRESENTAÇÃO DA MAIORIA DAS VIAS DE SÍNTESE DE PUFA NOS ANIMAIS. NA VERTICAL ESTÃO REPRESENTADAS AS DESSATURACÕES E NA HORIZONTAL OS ALONGAMENTOS DA CADEIA. | 14 |
| ILUSTRAÇÃO 8 – OS LOCAIS E AS REACÇÕES ENVOLVIDAS NA DIGESTÃO E NA ABSORÇÃO DE GORDURA (CUNNINGHAM, 1999)..... | 15 |
| ILUSTRAÇÃO 9 – N-6 E N-3 PUFAS E SEUS RESPECTIVOS METABOLISMOS E ORIGENS.. | 17 |
| ILUSTRAÇÃO 10 – CONVERSÃO DOS AG DA DIETA PARA PUFAS DE CADEIA LONGA, ATRAVÉS DE DESSATURACÃO E ALONGAMENTO E PERCURSORES DOS EICOSANOIDES (A AMARELO), POR 3 VIAS | 18 |
| ILUSTRAÇÃO 11 – VÁRIOS EXEMPLOS DE GLICEROFOSFOLÍPIDOS <i>IN</i> (HAMES & HOOPER, 2005) | 19 |
| ILUSTRAÇÃO 12 – ESTRUTURA CARBONADA NUMERADA DO COLESTEROL (NELSON & COX, 2000)..... | 19 |
| ILUSTRAÇÃO 13 – ESTRUTURA DA ESFINGOMIELINA, DA GALACTOCEREBROSIDA (A) E DO COLESTEROL (B)..... | 19 |
| ILUSTRAÇÃO 14 – ESQUEMA DO SISTEMA NERVOSO <i>IN</i> (VILELA) | 20 |
| ILUSTRAÇÃO 15 – TRÊS TIPOS DE NEURÓNIOS | 21 |
| ILUSTRAÇÃO 16 – ZONAS DE RISCO PROPOSTAS PARA O ÍNDICE ÔMEGA-3 POR HARRIS E SCHACKY (2007) | 23 |
| ILUSTRAÇÃO 17 - GRÁFICO INDICADOR DAS RAZÕES DE DEPOSIÇÃO DO DHA NO CÉREBRO, MÚSCULO, FÍGADO, ERITRÓCITOS E TECIDO ADIPOSO. | 36 |
| ILUSTRAÇÃO 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA, CAIXA DE BIGODES, DE VALORES OUTLIERS EXTREMOS DOS INDIVÍDUOS 4.31 E 4.12 NA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS 22:6 N-3 (DIREITA) E 22:5 N-6 NO GRUPO F2..... | 55 |
| ILUSTRAÇÃO 19 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA, CAIXA DE BIGODES, DE VALORES OUTLIERS EXTREMOS DOS INDIVÍDUOS 1.47, 4.12 E 6.28 NA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GORDO 20:6N-6 NOS GRUPOS S, F2 E F2L, RESPECTIVAMENTE. | 55 |
| ILUSTRAÇÃO 20 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA, CAIXA DE BIGODES, DE VALORES OUTLIERS EXTREMOS DOS INDIVÍDUOS 1.47 E 6.28 NA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS 18:1N-9 NOS GRUPOS S E F2L, RESPECTIVAMENTE..... | 56 |
| ILUSTRAÇÃO 21 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA, CAIXA DE BIGODES, DE VALORES OUTLIERS EXTREMOS DOS INDIVÍDUOS 1.47, 3.04 E 6.28 NA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GORDO ANTE ISSO 16:0 NOS GRUPOS S, F1 E F2L, RESPECTIVAMENTE. | 56 |
| ILUSTRAÇÃO 22 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA, CAIXA DE BIGODES, DE VALORES OUTLIERS EXTREMOS DOS INDIVÍDUOS 1.47, 3.04, 3.39 E 6.28 NA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO GORDO 14:0 NOS GRUPOS S, F1 E F2L, RESPECTIVAMENTE. | 57 |
| ILUSTRAÇÃO 23 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA, CAIXA DE BIGODES, DE VALORES OUTLIERS EXTREMOS DO INDIVÍDUO 6.11 NA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS 15:0 E 16:0 NOS GRUPO F2L. NO GRÁFICO DO AG 16:0 TAMBÉM É VISÍVEL QUE O INDIVÍDUO 1.17 É UM OUTLIER, RESPECTIVAMENTE..... | 58 |

Objectivos:

O presente estudo encontra-se inserido no projecto “PTDC/2006/70560” que pretende avaliar o efeito da ingestão regular de diferentes níveis de sardinha e tomate, e da sua interacção, na concentração de lípidos e antioxidantes nos diferentes órgãos, bem como os mecanismos associados aos processos metabólicos, endócrinos e genéticos, com o intuito de esclarecer a importância dos n-3 PUFA na saúde humana.

O principal objectivo desta dissertação é a avaliação do efeito da ingestão regular de diferentes doses de conserva de sardinha (factor óleo de sardinha) e o seu efeito no perfil de ácidos gordos do cérebro, músculo e eritrócitos de ratos Wistar. Pela impossibilidade de quantificar os valores de licopeno nas dietas e nos diferentes tecidos, vai ser analisado estatisticamente a interferência do tomate (factor tomate) na incorporação de AG nos tecidos de ratos wistar em relação ao factor óleo de sardinha. Deste modo pretende-se responder às seguintes questões:

1. Análise factorial de 3 factores de óleos no perfil lipídico:

- 1.1. Contrastes (Análise de tendências) para comparação dos óleos de soja e de sardinha (S vs.F1+F2)
- 1.2. Contrastes (Análise de tendências) para comparação de dois níveis (11% e 22%) de óleo de sardinha (F1 vs. F2)
- 1.3. Qual o efeito do tomate (SL+F1L+F2L vs. S+F1+F2)?
- 1.4. Interacção do efeito do tomate com o óleo de base (óleos de soja ou de sardinha)

2. Análise de Regressão de 3 níveis de sardinha (não inclui os eritrócitos):

- 2.1. Qual o efeito do nível de incorporação do óleo de sardinha sem tomate (linear ou quadrática)
- 2.2. Qual o efeito do nível de incorporação do óleo de sardinha com tomate (linear ou quadrática)
- 2.3. Qual a interacção dos dois níveis de incorporação (comparação dos declives das rectas)

Com os resultados obtidos tentar inferir sobre:

- Os benefícios da ingestão de conservas de sardinha em tomate como alimento funcional.

1 – Revisão Bibliográfica

1.1 Hábitos alimentares no século XXI condicionam a razão n-6/n-3

Durante milhares de anos a dieta do Homem teve como base os hidratos de carbono, sendo o teor em gordura residual. Na época do Paleolítico houve a introdução de ovos, carne animal (magra), tubérculos, nozes, etc. e, mais tarde, os hominídeos arcaicos, introduziram os produtos do mar (Pérez-López, Chedraui, Haya, & Cuadros, 2009). Desde então a selecção e a adaptação do Homem foi direccionada para uma razão n-6/n-3 entre 1-2:1.

A civilização actual, principalmente após a industrialização, devido aos seus hábitos quotidianos, tem aumentado a ingestão de gordura, principalmente a saturada, o que, com a conjugação de factores como o “stress” e a falta de exercício físico, tem aumentado o risco de patologias cardiovasculares (Huang & Sumpio, 2008). A dieta mediterrânica tem comprovado ao longo dos tempos ser benéfica para a saúde, pois diminui o risco de patologias cardíacas e vasculares (Pérez-López, Chedraui, Haya, & Cuadros, 2009). Esta diminuição do risco prende-se com a utilização de alimentos ricos em MUFAs, como o azeite com o 18:1, e PUFA, caso do peixe gordo com AGs n-3 como o 20:5n-3 (EPA – Ácido eicosapentaenóico) e o 22:6n-3 (DHA - Ácido docosahexaenóico).

Para a diminuição do risco destas patologias cardiovasculares, a ingestão de PUFA sem uma orientação pode não trazer benefícios para a saúde. É o caso “paradoxo” dos habitantes de Israel citado por Dubnov e Berry (2008), que consomem elevadas quantidades de n-6 e têm índices de prevalência de doenças crónicas idênticos à população Ocidental. Estes dados vêm justificar a necessidade de haver um equilíbrio entre os AG n-3 e n-6. Segundo Belsey (2008) as sociedades primitivas e pré-industriais situavam o sua razão n-6/n-3 em 1-2/1, enquanto, as modernas sociedades – Ocidentais, situam a sua razão em: Estados Unidos – 10/1; UK – 16/1; Europa – 10-14/1. O Japão é o país que mais se aproxima dos valores das sociedades pré-industriais: 4/1, e como resultado tem uma incidência de doenças cardíacas relativamente baixa (Kitts, 2001).

Para reduzir a razão n-6/n-3, é necessário introduzir na alimentação PUFA n-3, como o DHA, EPA e ALA (Ácido α -Linolénico - 18:3:n-3). Os melhores alimentos para fornecer o ALA são o óleo de linhaça, nozes e soja, e o EPA e DHA dos peixes, como o salmão, sardinha, truta (Tabela 1), e o leite materno (Whitney & Rolfes, 2008). Segundo Kitts (2001), dietas com sementes de linhaça, ricas em ALA, e óleos de peixes marinhos, ricos em EPA e DHA, protegem, não só de patologias cardiovasculares, mas também do cancro da mama.

Tabela 1 – Valores de AG (mg/100g) da sardinha e salmão em 3 condições distintas: Fresca, grelhada e em conserva e da truta crua. In (Bandarra, et al., 2009)

| Ácidos gordos (mg/100 g) <i>Fatty acids</i> | | | | | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|--------------------------------------|--|---------------|---------------|
| Sardinha (<i>Sardina pilchardus</i>) | | | | Truta (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) | Salmão do atlântico (<i>Salmo salar</i>) | | |
| | Cru | Grelhado | Conserva | Cru | Cru | Grelhado | Conserva |
| 14:0 | 572,3 | 445,4 | 58,5 | 61,9 | 1049,7 | 1048,2 | 1107,2 |
| 15:0 | 45,9 | 37,6 | 10,4 | 10,2 | 62,9 | 65,1 | 77,6 |
| 16:0 | 1695,3 | 1487,6 | 1994,7 | 318,7 | 2687,7 | 2450,1 | 2753,5 |
| 17:0 | 107,0 | 81,3 | 0,0 | 2,0 | 33,8 | 0,0 | 0,0 |
| 18:0 | 312,6 | 288,2 | 301,5 | 75,6 | 457,2 | 453,4 | 511,1 |
| ΣSFA | 2745,9 | 2396,3 | 3001,4 | 473,0 | 4291,3 | 4049,4 | 4487,6 |
| 16:1n-7 | 741,1 | 555,6 | 148,1 | 5,7 | 1343,9 | 1473,6 | 1572,3 |
| 18:1 | 979,8 | 742,1 | 4375,7 | 440,4 | 3809,7 | 2450,1 | 2821,6 |
| 20:1n-9 | 378,9 | 320,3 | 48,6 | 3,0 | 2272,4 | 1459,2 | 1666,0 |
| 20:1n-7 | 8,8 | 18,7 | 15,1 | 0,0 | 131,9 | 198,7 | 195,5 |
| 22:1 | 448,9 | 432,5 | 21,0 | 61,6 | 2479,4 | 1456,6 | 1652,8 |
| ΣMUFA | 2557,5 | 2069,4 | 5674,9 | 515,3 | 10037,3 | 7824,5 | 8747,4 |
| 16:4n-3 | 184,5 | 117,4 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 83,4 | 91,5 |
| 18:2n-6 (LA) | 104,5 | 85,8 | 423,8 | 204,2 | 691,2 | 603,9 | 695,0 |
| 18:3n-3 (ALA) | 76,8 | 5,3 | 58,0 | 104,0 | 181,9 | 196,7 | 225,6 |
| 18:4n-3 | 321,4 | 234,5 | 19,5 | 21,0 | 363,9 | 357,0 | 405,7 |
| 20:4n-6 | 82,9 | 75,1 | 28,0 | 14,8 | 56,1 | 105,5 | 116,4 |
| 20:5n-3 (EPA) | 1671,8 | 1287,9 | 791,7 | 89,0 | 1172,1 | 1629,9 | 1800,0 |
| 22:5n-3 | 196,0 | 154,8 | 31,8 | 31,8 | 485,6 | 632,5 | 714,0 |
| 22:6n-3 (DHA) | 1169,4 | 1334,2 | 1255,7 | 386,7 | 1772,6 | 2326,3 | 2593,8 |
| ΣPUFA | 4071,0 | 3493,8 | 2806,0 | 851,3 | 5148,2 | 6554,2 | 7315,0 |
| n-3 | 3753,3 | 3245,9 | 2307,7 | 632,4 | 4326,4 | 5622,6 | 6255,4 |
| n-6 | 317,7 | 247,9 | 498,3 | 218,9 | 765,6 | 968,0 | 1103,6 |
| n-3/n-6 | 11,8 | 13,1 | 4,6 | 2,9 | 5,7 | 5,8 | 5,7 |

1.2 - Sardinha em Conserva

1.2.1 – História

Desde que Nicholas Appert inventou a apertização em 1795 a pedido de Napoleão, para que o seu exército não passasse fome nas invasões francesas, as conservas evoluíram, e têm sido utilizadas e consumidas até aos dias de hoje. A sardinha em conserva é um exemplo de que se perpetua no tempo.

A sardinha em conserva hoje é apresentada através de muitas variedades: em óleo vegetal, em azeite, em filetes, em caldeirada, sem espinhas, em limão, sem pele, em tomate, etc.

As vantagens, para a saúde, da ingestão de sardinha devem-se aos seus teores elevados em PUFA's n-3 como demonstra a Tabela 1 e a Tabela 2, onde as quantidades dos EFA (Ácidos Gordos Essenciais), DHA e EPA são os predominantes.

Tabela 2 – Composição dos MUFA e PUFA de sardinha segundo The George Mateljan Foundation (The George Mateljan Foundation, 2001-2009)

| MUFA | | PUFA | |
|--------------------|--------|---------------------|---------------|
| Total | 3,56g | Total | 4,74g |
| 14:1 myristol | 0.00 g | 18:2 linoleic | 3.26 g |
| 15:1 pentadecenoic | 0.00 g | 18:3 linolenic | 0.46 g |
| 16:1 palmitol | 0.20 g | 18:4 stearidon | 0.12 g |
| 17:1 heptadecenoic | 0.00 g | 20:3 eicosatrienoic | 0.00 g |
| 18:1 oleic | 1.97 g | 20:4 arachidon | 0.00 g |
| 20:1 eicosen | 0.39 g | 20:5 EPA | 0.44 g |
| 22:1 erucic | 0.99 g | 22:5 DPA | 0.00 g |
| 24:1 nervonic | 0.00 g | 22:6 DHA | 0.47 g |

Uma variedade de sardinha em conserva consumida em Portugal é a “Conserva de sardinha em tomate”. Esta apresenta também, todos os benefícios das propriedades antioxidantes do licopeno, presente no tomate, com provas dadas na prevenção de inúmeras doenças. A biodisponibilidade deste antioxidante é tanto maior quanto maior for a destruição celular do tomate antes da ingestão, como a cozedura ou a apertização.

1.2.2 – Sardinha como alimento funcional

A nutrição do cidadão do século XXI enfrenta novos desafios, pois a saúde não passa apenas pela ausência de doença, mas sim pelo bem-estar físico, mental e psicológico, sendo que o alimento já não tem o objectivo único de desenvolvimento e crescimento do organismo, mas sim um papel fulcral na qualidade de vida.

O conceito de nutrição está a mudar, se já não se alterou totalmente, isto é, estamos a passar do conceito de nutrição adequada para o de nutrição óptima (FUFOSE, 1999). Assiste-se à mudança da procura de comida para satisfazer a saciedade, da comida que não faça mal à saúde, da comida para manter a saúde, para procurar comida que promova melhorias na saúde e no bem-estar ajudando assim a diminuir o risco de certas doenças.

Segundo dados do IFIC (2007) os consumidores americanos acreditam que a sua alimentação e o nível nutricional dos alimentos que consomem são os factores primordiais na manutenção e aumento da sua saúde, mais até que o exercício físico e a sua genética.

Esta nova preocupação, de procura de alimentos funcionais, não nasceu neste século. Nasceu no século XX, em meados de 1930, com o Dr. Minoru Shirota, no Japão, quando iniciou uma investigação de leite fermentado que prevenia doenças intestinais.

É importante clarificar que um alimento funcional, ou melhor a Ciência dos Alimentos Funcionais, faz parte da nutrição e não de uma área médica ou farmacêutica, pois aquela preocupa-se em manter ou aumentar as condições de saúde, reduzindo os factores de risco para certas doenças. Enquanto a área médica e farmacêutica, tem como objectivo primário a cura de doenças ou patologias. O que não invalida que recorram à nutrição para prevenir ou incrementar melhorias na saúde, como sejam os alimentos especiais, os suplementos alimentares e mesmo os alimentos funcionais.

Um alimento é dito funcional quando, na sua constituição, tem um ou mais componentes que afectam de maneira positiva uma ou mais funções no organismo (FUFOSE, 1999). Também podem ser considerados alimentos funcionais aqueles lhe foram retirados certos componentes que causariam efeitos deletérios na saúde.

Na Europa para os alimentos serem considerados funcionais têm que ter bases científicas que evidenciem os mecanismos de que uma “target function”¹ (FUFOSE, 1999).

Assim, um Alimento Funcional pode ser um alimento natural (ex: azeite, sardinha, sardinha em conserva, etc.), um alimento com um ou mais componentes adicionais (ex: ovos ricos em n-3, iogurtes com *bifidus actiregularis*, pão enriquecido com n-3, etc.) ou um alimento em que foi removido um ou mais dos seus componentes (ex: Leite sem lactose). A FUFOSE (1999) afirma que ficam excluídos deste grupo de alimentos os que tomam a forma física de comprimidos, pílulas, pastilhas e outros similares, assim só aqueles na sua forma e padrão normal é que podem ser considerados Alimentos Funcionais.

Bem como a Agriculture and Agri-Food Canada (2009) diferencia alimento funcional de nutracêutico. O primeiro, é um alimento convencional ou semelhante na sua aparência, e que é parte integrante da dieta regular. Demonstra ter benefícios fisiológicos e/ou reduzir o risco de doenças crónicas, além das funções nutritivas básicas; o nutracêutico é uma ou várias substâncias isoladas ou purificadas de alimentos que geralmente são vendidas em fórmulas medicamentosas, não estando associadas com alimentos. É considerado um nutracêutico aquela substância que têm benefícios fisiológicos e que providencia protecção contra doenças crónicas.

Consideram-se alimentos especiais ou alimentos dietéticos (Camilo, 2009), os que têm um objectivo nutricional pretendido, isto é, suprimir necessidades nutricionais de um indivíduo numa menor condição de saúde, como seja (Decreto-Lei 227/99 de 22 de Junho, 1999):

- Cujo processo de assimilação ou cujo metabolismo se encontra perturbado;
- Em condições fisiológicas especiais;

¹ Função alvo

- Lactentes ou crianças de 1 a 3 anos de idade em bom estado de saúde.

No que concerne aos suplementos alimentares, estes são “géneros alimentares que se destinam a complementar e ou a suplementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, estremes ou combinadas, comercializadas em forma doseada, tais como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes (...)” *in* (Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 de Junho, 2003).

1.2.3 - O Tomate como alimento funcional

O metabolismo de um indivíduo normal produz cerca de 1,72 Kg de radicais superóxidos por ano (Halliwell, 1999). Isto deve-se essencialmente ao metabolismo aeróbio que utiliza o oxigénio nas reacções químicas homeostáticas.

Segundo Hogg (1998) os radicais livres estão implicados quer na iniciação e progressão de algumas doenças cardiovasculares, alguns tumores, cataratas, degenerescência macular relacionada com a idade, artrite reumatóide e algumas doenças degenerativas.

A forma de controlar os processos oxidativos excessivos, que possam causar danos ao organismo, passa por otimizar a ingestão de antioxidantes através de frutas e vegetais ou através de alimentos funcionais (Surai, Benadé, & Speake, 2008).

Os antioxidantes podem ser divididos em 2 grupos distintos (Olia, 2008): antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GSHPx) e a catalase, e os antioxidantes não-enzimáticos como o ácido ascórbico, a vitamina E, os flavenóides e os carotenóides.

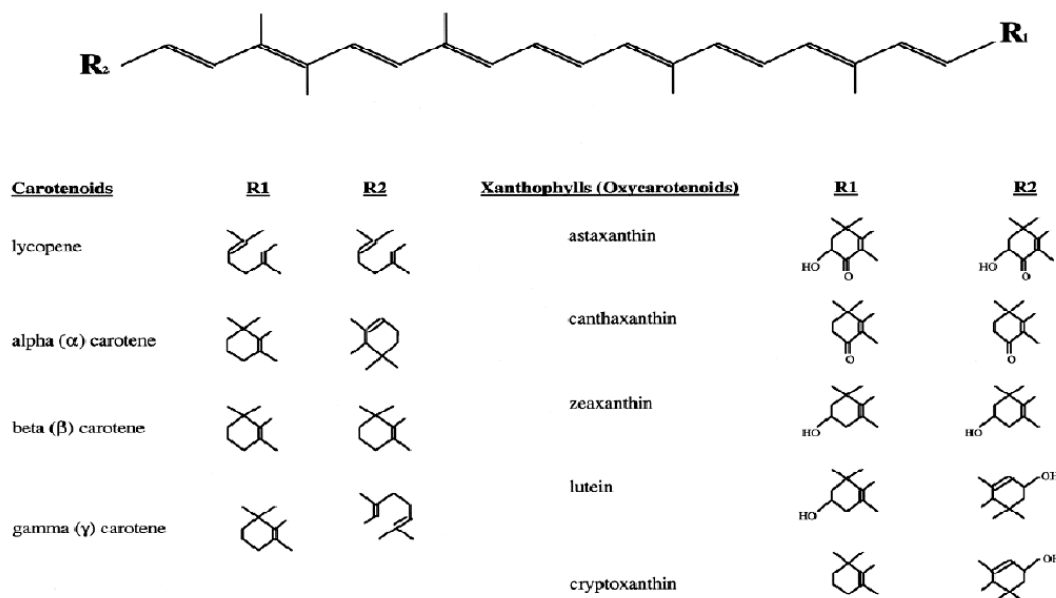
O licopeno pertence ao grupo dos antioxidantes não enzimáticos carotenóides, cuja estrutura química se encontra na Ilustração 1 juntamente com outros carotenóides mais conhecidos. É um isómero acíclico do β -caroteno, com 40 átomos de carbono, com a fórmula molecular de $C_{40}H_{56}$.

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis com excelentes propriedades antioxidantes, e segundo Khachih, Beecher e Smith (1995) são a base para protecção contra o cancro. É uma família com mais de 600 compostos e são responsáveis pelas cores vivas dos alimentos que os contêm, como o vermelho do salmão e do tomate. Foi este último, Tomate: *Solanum lycopersicum*, que por ter quantidades elevadas de licopeno lhe originou o nome.

Resultados, *in vitro*, de DiMascio, Kaiser e Sies (1989) demonstram que as moléculas dos carotenóides, como o licopeno, são efectivamente antioxidantes pois têm uma capacidade

singular de bloquear o oxigénio e de se ligar quer aos radicais livres quer aos radicais peróxido.

Ilustração 1 – Estrutura dos carotenóides mais comuns, à esquerda. *in* (Wildman, 2001)



O licopeno é um dos carotenoides com maior expressão a nível alimentar, pois encontra-se presente em muitos alimentos em diferentes quantidades (Tabela 3). Ao contrário de outros micronutrientes como a vitamina C, a concentração do licopeno não decresce com o processamento alimentar. Pelo contrário, o tomate processado pode aumentar a biodisponibilidade do licopeno como são exemplos alguns dos alimentos da Tabela 3. Devido à sua estrutura molecular de propriedades hidrofóbicas (Willcox, Catignani, & Lazarus, 2003), a sua biodisponibilidade pode ser incrementada quando acompanhado de óleos.

Tabela 3 – Concentração de licopeno (mg/100g) em vários alimentos. *in* (Lycocard, 2006)

| Produto | Licopeno (mg/100g) |
|-----------------------------|--------------------|
| Toranja rosa | 1,4 |
| Tomate cru (vermelho) | 2,6 |
| Tomate em conserva | 2,7 |
| Melancia | 4,5 |
| Goiaba | 5,2 |
| Sumo de tomate | 9,0 |
| Sopa de tomate (condensada) | 10,9 |
| Ketchup de tomate | 16,7 |
| Molho de esparguete | 18,6 |
| Pasta de tomate | 28,8 |
| Tomate em pó | 46,3 |

Após a sua absorção este concentra-se nas LDL e VLDL do soro (Lycocard, 2006) e nas membranas celulares de alguns tecidos humanos (Bruno & Wildman, 2001) (Olia, 2008).

Além das suas propriedades antioxidantes, apresenta também propriedades cardioprotectoras, anti-inflamatórias, antimutagénicas e anticarcinogénicas (Bhuvaneswari & Nagini, 2005) (Olmedilla, Granado, Gil, Blamco, & Rojas, 1997).

1.3 - Desafios para a segurança Alimentar dos Alimentos funcionais?

Antes de serem enumerados os potenciais perigos inerentes aos alimentos funcionais, convém clarificar o que são perigos nutricionais e perigos no âmbito da segurança alimentar.

Os primeiros dizem respeito à nutrição propriamente dita. Uma alimentação pouco variada e desequilibrada nutricionalmente pode acarretar problemas de saúde, como é o caso do excesso de aporte calórico causar obesidade ou o excesso de gorduras, principalmente saturadas, causar doenças cardiovasculares.

No que respeita à segurança alimentar devemos ter em conta os 3 tipos de perigos: químicos, biológicos e físicos. Estes podem resultar das várias etapas do processo desde “o prado ao prato”. Os desafios para a segurança alimentar dos alimentos funcionais estão em novos produtos, com ingredientes/nutrientes/nutracêuticos em concentrações diferentes do que é o normal. Esta diferença pode levar a um comportamento do alimento diferente do esperado ao longo do seu período de vida útil, ao nível químico ou bacteriológico. Por exemplo, uma degradação prematura do produto, pode acontecer em alimentos com uma maior concentração de PUFA's, estes aumentam a probabilidade de ocorrerem fenómenos de oxidação, designado também por ranço, com produção de aldeídos e cetonas.

O Documento de Consenso dos Conceitos Científicos de Alimentos Funcionais na Europa (FUFOSE, 1999), recomenda que todos os alimentos funcionais devem ser seguros de acordo com todos os padrões de análise de risco alimentar. Assim, é necessário testar e justificar com bases científicas o comportamento dos alimentos funcionais ao longo de toda a cadeia alimentar.

1.4 - Os Lípidos

“Biological lipids are a chemically diverse group of compounds, the common and defining feature of which is their insolubility in water” (Nelson & Cox, 2000)

No senso comum a característica mais conhecida dos lípidos é sem dúvida a sua insolubilidade em água. No entanto, os lípidos são um grupo, vasto e heterogéneo, de substâncias de origem biológica e que são facilmente solúveis em solventes não polares

como os seguintes solventes orgânicos: metanol, acetona, clorofórmio e benzeno (Koolman & Roehm, 2005).

São conhecidas as suas propriedades homeostáticas nos seres vivos, quer ao nível do isolamento térmico e depósito de reservas energéticas, quer na estrutura das membranas biológicas, através dos fosfolípidos e esteróis, e em pequenas quantidades, ao funcionarem como cofactores enzimáticos, transportadores de electrões, pigmentos absorventes de luz, âncoras hidrofóbicas, agentes emulsificantes, hormonas e mensageiros intracelulares (Nelson & Cox, 2000).

Tendo em conta a sua estrutura e propriedades físicas, os lípidos podem ser agrupados nas seguintes classes maioritárias (Voet & Voet, 1995):

- Ácidos Gordos
- Triacilgliceróis
- Glicerofosfolípidos
- Esfingolípidos
- Esteróis

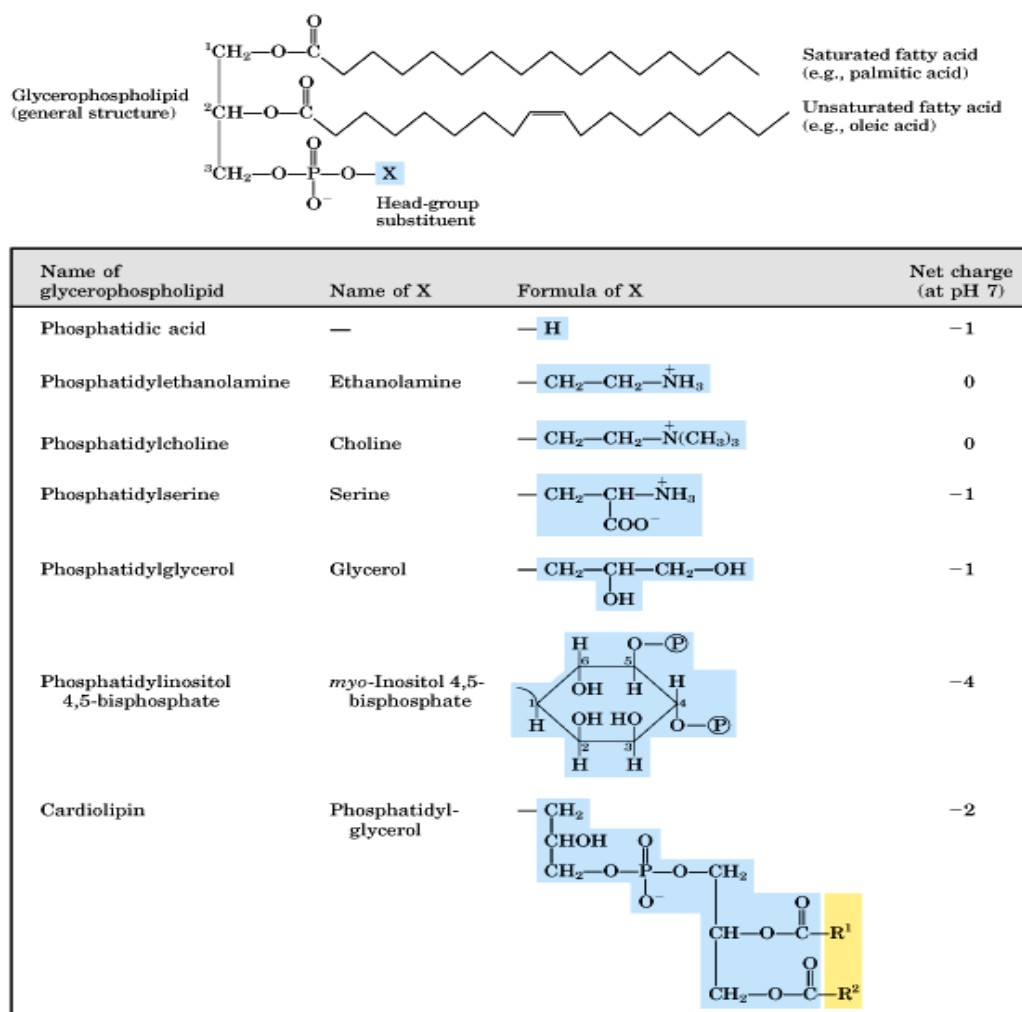
Os ácidos gordos raramente aparecem em natureza, aparecendo na forma esterificada em vários lípidos, em que a sua composição em resíduos de ácidos gordos saturados (SFA) ou insaturados, influencia a fluidez lipídica, aumentam numa razão directa com o grau crescente de insaturação (Voet & Voet, 1995).

Os triacilgliceróis, substâncias insolúveis em água e não polares, são constituídos por um glicerol e três ácidos gordos esterificados. A sua função principal nos organismos vivos é a reserva energética e não a constituição das membranas biológicas (Voet & Voet, 1995). As gorduras e os óleos (que diferem somente na sua aparência à temperatura ambiente) são misturas complexas de triacilgliceróis, em que normalmente os oriundos das plantas são mais ricos em PUFA que os de origem animal. Nestes as células especializadas para o armazenamento dos triacilgliceróis são os adipócitos.

Os glicerofosfolípidos, são os constituintes maioritários das membranas celulares (Voet & Voet, 1995) e como Voet e Voet (1995) descreve “ Glicerofosfolípidos são moléculas anfífilas com uma “cauda” não polar alifática e uma “cabeça” polar fosforil-X”.

A estrutura geral, presente na Ilustração 2, realça que a alteração do X no grupo fosforil altera a sua estrutura. Sendo que a mais simples, o ácido fosfatídico, corresponde à substituição do X por um Hidrogénio (Ilustração 2).

Ilustração 2 – Glicerofosfolípidos (Nelson & Cox, 2000)



Normalmente, o glicerofosfolípido tem no seu C1 esterificado um SFA e no C2 um UFA (Unsaturated Fatty Acid) (Ilustração 2). Quando no C1 há substituição da molécula de glicerol, ligação éster, para uma ligação éter- α,β -insaturada passamos a ter um plasmogénio.

Os esfingolípidos também são um dos constituintes maioritários das membranas celulares. Derivam de amino-álcoois C18 como a esfingosina e di-hidroesfingosina. Os seus derivados mais frequentemente encontrados são as esfingomielinas, os cerebrosídeos e os gangliosídeos. A esfingomielina é encontrada na bainha de mielina dos axónios, os cerebrosídeos nas membranas neuronais do cérebro e os gangliosídeos são os componentes primários da superfície membranar das células nervosas e constituinte significativo dos lípidos cerebrais (6%) (Voet & Voet, 1995).

Os esteróis são derivados do ciclopentanoperihidrofenantreno. Um deles, e o mais importante, por ser aquele que se encontra em maior concentração nas membranas plasmáticas animais, é o colesterol. No entanto, aparece em menor concentração nos

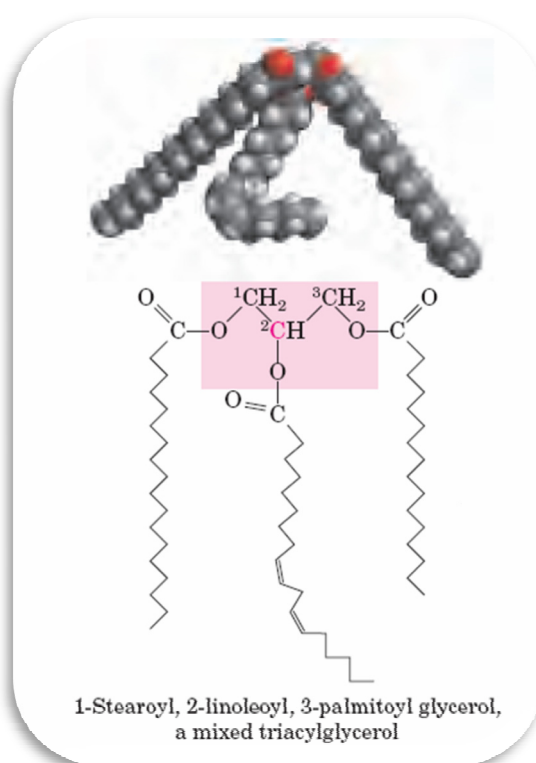
organelos subcelulares animais. É também um precursor das hormonas esteróides, como a progesterona, aldosterona e a testosterona.

Um hidrocarboneto, que é necessário enquadrar, como composto de base lipídica, é o licopeno presente no tomate. Composto alifático polinsaturado de cadeia longa, com 13 ligações duplas, 11 das quais conjugadas (Ilustração 1).

1.4.1 - Ácidos Gordos como elementos constituintes dos lípidos

Nos organismos vivos os ácidos gordos (AG) têm presença maioritária através de triacilgliceróis. Um triacilglicerol consiste numa molécula esterificada de glicerol com três ramos de ácidos gordos. (Ilustração 3).

Ilustração 3 – Molécula de Triacilglicerol: 3 ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol (rosa). *In* (Nelson & Cox, 2000)



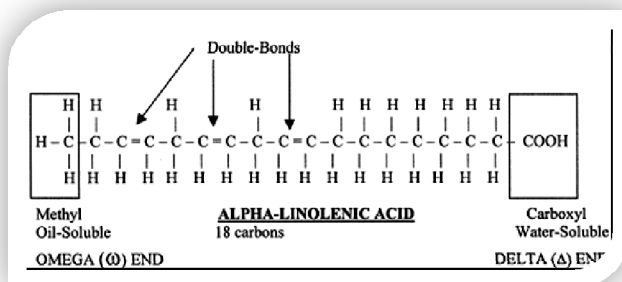
Os AG são ácidos carboxílicos que podem ir desde os 4 aos 36 carbonos. Apresentam na extremidade Delta (Δ), um grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) hidrofílico, e na extremidade oposta Omega (n -) grupo Metilo ($-\text{CH}_3$), hidrofóbico. (Ilustração 4).

Estes podem ser classificados em Saturados (SFA), Monoinsaturados (MUFA) ou Polinsaturados (PUFA), consoante o número de ligações duplas no esqueleto carbonado, zero, uma ou mais que uma respectivamente.

Os SFA caracterizam-se por não possuírem ligações duplas na cadeia carbonada o que origina uma estrutura molecular plana e que em conjunto com outros AG saturados,

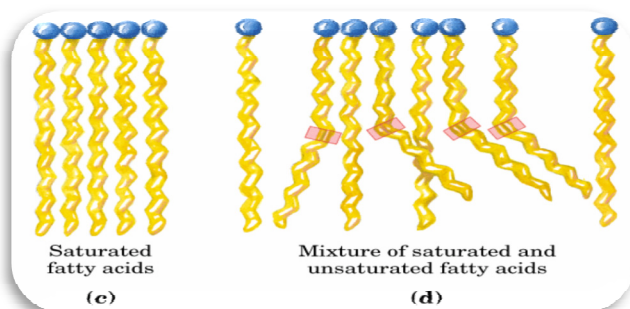
organizam-se de forma ordenada e justaposta (Ilustração 5). A sua fórmula comum é $R-COOH$, em que o grupo R é uma cadeia carbonada com a forma $CH_3(CH_2)_x$ ou C_nH_{2n+1} . Estas características conferem uma textura sólida à temperatura ambiente das gorduras maioritariamente saturadas.

Ilustração 4 – Ácido alfa-Linolénico (18:3n-3) in (Best)



Os MUFA diferem dos PUFA por apresentarem somente uma ligação dupla na cadeia carbonada enquanto os PUFA apresentam 2 ou mais ligações.

Ilustração 5 – Comparação da disposição entre AG saturados e MUFA/PUFA (Nelson & Cox, 2000)



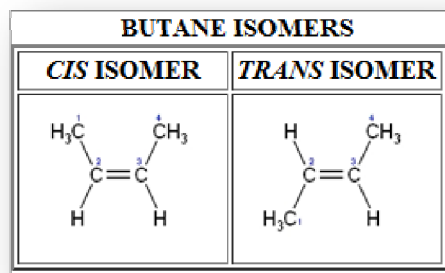
Os AG com ligações duplas podem apresentar-se com duas configurações, a **cis** e a **trans**. A mais frequente é a **cis**, em que a cadeia de carbonos está do mesmo lado da ligação dupla. Na configuração **trans** a cadeia de carbonos está em lados opostos da ligação dupla (Ilustração 6).

A letra grega ómega (ω) é utilizada para indicar a distância, em átomos de Carbono, da ligação dupla ao grupo metilo terminal (Ilustração 4).

1.4.2 – Metabolismo lipídico

Pode-se considerar que o metabolismo lipídico começa, como noutros nutrientes, com a digestão, processo de decomposição de nutrientes complexos em moléculas mais simples, e a absorção, processo de transporte dessas moléculas mais simples através do epitélio intestinal (Cunningham, 1999).

Ilustração 6 – Diferenças entre a configuração cis e trans. In (Best, 1990)



No entanto os lípidos podem ser biossintetizados a partir da glucose, o que leva a ter de se diferenciar duas vias de obtenção de lípidos:

- Via exógena: lípidos obtidos a partir de lípidos da dieta;
- Via endógena²: lípidos obtidos pela biossíntese de outros compostos que não lípidos, por exemplo a partir da glucose (via Piruvato - Acetyl-CoA) (Cunningham, 1999);

Os lípidos ingeridos com a dieta necessitam de ser emulsionados no tracto gastrointestinal para que possam sofrer a acção de enzimas hidrolíticas hidrossolúveis e possam ser absorvidos. Esta absorção pode ser dividida em 4 fases (Cunningham, 1999): emulsificação, hidrólise, formação de micelas e absorção propriamente dita:

1. Emulsificação: começa no estômago, com as acções: mecânica e térmica, e termina no intestino delgado, com a acção detergente dos ácidos biliares e fosfolípidos. Estes últimos diminuem a tensão superficial dos lípidos o que permite a redução do tamanho das suas gotículas.
2. Hidrólise: Através de enzimas hidrolíticas hidrossolúveis do pâncreas: lipase e co-lipase, as gotículas são hidrolisadas. A lipase com a ajuda da co-lipase rompe a ligação dos ácidos gordos de cada extremidade da molécula de triacilglicérido, não atacando o AG central, resultado assim: dois AG livres (ou não-esterificados) e um monoglicérido.
Outras enzimas como a colesterol-esterase e a fosfolipase também digerem lípidos, resultando produtos como: AG não-esterificados, colesterol e lisofosfolípidos.
3. Formação de micelas: Resultam da combinação dos produtos da digestão dos lípidos com os ácidos biliares e fosfolípidos, tomando uma conformação esférica e permitem que os lípidos se difundam através do lúmen intestinal para a camada

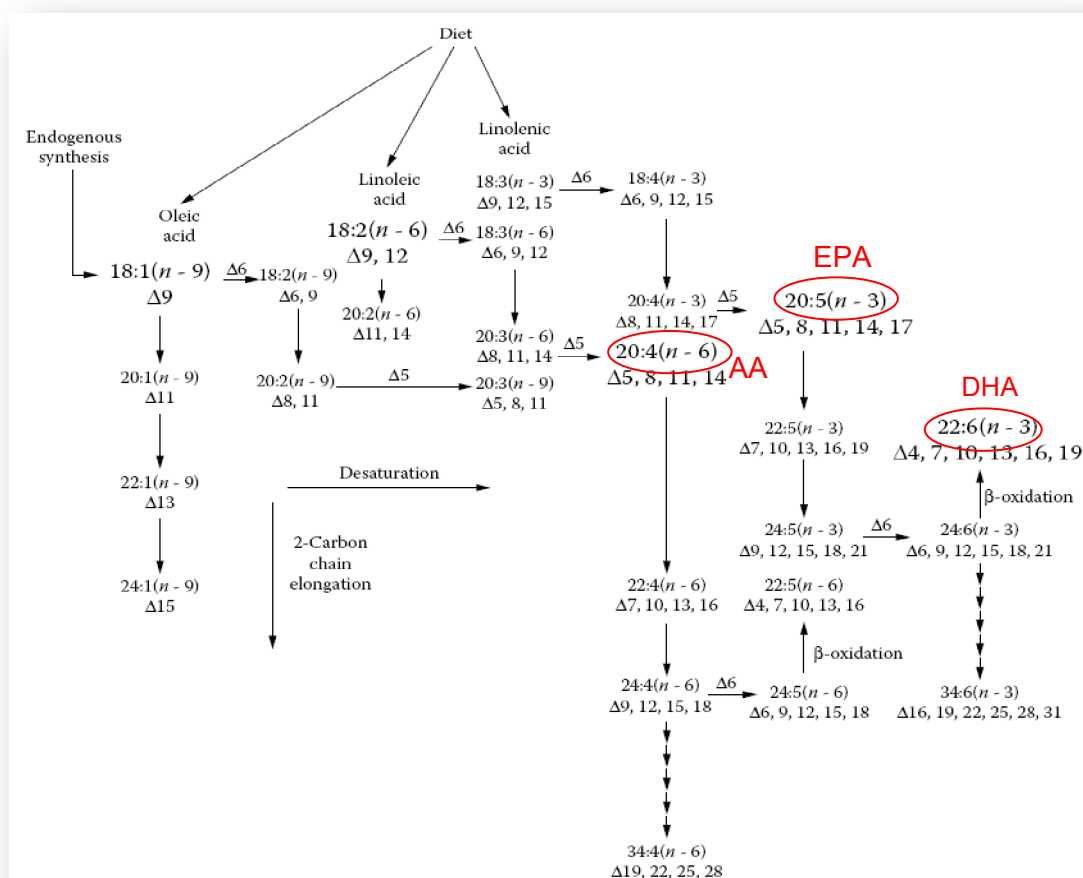
² Devido ao âmbito desta dissertação a via endógena não vai ser abordada

aquosa estacionária e contactando assim com a superfície de absorção da membrana apical do enterócito.

4. Absorção: uma vez as micelas na superfície apical do enterócito³, os AG podem ser captados e transportados para o interior da célula pelas FABP (Fatty Acid Binding Protein). No entanto há elementos micelares que simplesmente se difundem na membrana apical, como os monoglicéridos, o colesterol e a vitamina A (Cunningham, 1999).

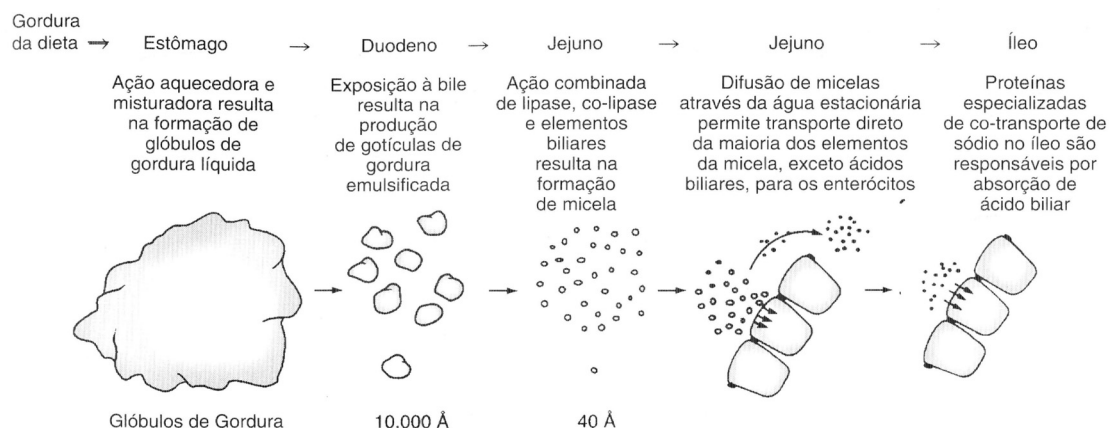
Já no interior do enterócito os AG são reesterificados e armazenados conjuntamente com o colesterol e outros lípidos em quilomicrons. Estas estruturas esféricas com a parte central hidrofóbica e a periférica hidrofílica, são o veículo de transporte dos lípidos absorvidos na dieta para a corrente sanguínea e posteriormente para os vários órgãos e tecidos.

Ilustração 7 – Representação da maioria das Vias de síntese de PUFA nos animais. Na vertical estão representadas as dessaturações e na horizontal os alongamentos da cadeia. O tamanho das letras representa, na maioria dos casos, a acumulação nos tecidos. *in* (Harwood, 2007)



³ Enterócito: tipo de célula epitelial da mucosa (camada superficial) do intestino delgado e grosso

Ilustração 8 – Os locais e as reacções envolvidas na digestão e na absorção de gordura (Cunningham, 1999)



1.4.3 – Ácidos Gordos Essenciais

O ser humano consegue sintetizar a maior parte dos AG que necessita quer os saturados quer os insaturados. No entanto há dois AG que necessitam de ser veiculados na dieta – Ácidos Gordos Essenciais (EFA – Essential Fatty Acids), são eles o ácido linoleico (AL) (18:2 n-6) e o ácido alfa-linolénico (ALA) (18:3 n-3).

É a partir destes AGs que através da dessaturação e alongamento da cadeia carbonada se pode obter outros AGs importantes como o AA (Ácido Araquidónico) (20:4n-6), EPA (Ácido eicosapentaenóico) (20:5n-3) e DHA (Ácido Docosahexaenóico) (22:6n-3), (Ilustração 7). Este processo é lento e, como Moher (2005) refere, é mais rápido obter estes AG através da alimentação.

1.4.4 – Ácidos gordos como precursores de eicosanóides e docosanóides

Eicosanóides são um grupo de mediadores inflamatórios derivados dos EFA com uma potente actividade biológica, localizada e de curta duração, segundos (Klurfeld, 2008), que como o nome indica, são constituídos por 20 Carbonos (do grego *eikosi* = 20).

Há uma relação complexa entre as gorduras ingeridas, os eicosanóides e o sistema imunitário. Essa relação deve-se aos precursores dos eicosanóides, os PUFA de cadeia longa (LCPUFA). Estes sofrem variações nas membranas celulares consoante o tipo de alimentação e AG ingeridos (Farooqui, 2009).

O AA (20:4n-6) é o LCPUFA com 20 carbonos predominante nas membranas, logo, a maioria dos eicosanóides são sintetizados a partir deste AG. No entanto, este pressuposto pode ser alterado tendo em conta que na síntese dos eicosanóides a enzima fosfolipase A₂ compete pelo substrato, n-6 e n-3, quando usa a membrana fosfolipídica.

A ingestão de razões menores de n-6/n-3 é favorável tendo em conta os mediadores inflamatórios que derivam de cada um destes grupos (Ilustração 9).

No caso do AA (n-6) é o precursor da “série 2” de Prostaglandinas (PGs), da série 4 dos Leucotrienos e dos TXA₂ (Tromboxanos A₂) que promovem a inflamação através de uma acção quimiotática potente, da vasoconstrição e da estimulação da agregação plaquetária. Pelo contrário, o EPA (n-3) é precursor da “série 3” de Prostaglandinas e tromboxanos que actuam como vasodilatadores e antiagregantes plaquetários (Lee & Hwang, 2008).

Os docosanóides, que têm o DHA como precursor, promovem uma diminuição dos factores pró-inflamatórios das citocinas.

Segundo o ISSFAL (ISSFAL, 2009), dietas com razões elevadas de LA/ALA diminuem a conversão do ALA em LCPUFA, e dietas ricas em AG n-6 influenciam as concentrações de n-3 LCPUFA nos tecidos. Como vários estudos realizados apontam para que o aumento de n-3 LCPUFA nos tecidos seja favorecido pela sua ingestão e/ou pela diminuição de ingestão de LA, é recomendável a ingestão de uma razão n-6/n-3 perto de 5:1 como recomenda a FAO e o Scientific Review Committee of Canada (ISSFAL, Global recommendations, 2007).

O ISSFAL (ISSFAL, 2009) refere que há evidência de que a conversão de ALA para DHA (Ilustração 10) é na ordem do 1% em crianças e que é considerável menor em adultos⁴. Este valor revela a importância da ingestão de n-3 LCPUFA, como o EPA e DHA, para incrementar a síntese de eicosanóides benéficos, “série 3” e docosanóides, respectivamente.

1.5 – Estrutura das membranas celulares

As membranas têm como função, não só a delimitação e compartimentação, mas também, proceder a uma regulação dos processos biológicos quer pelo controlo da entrada e saída de nutrientes, produtos do metabolismo celular, iões, etc., quer pelos “signaling processes”.

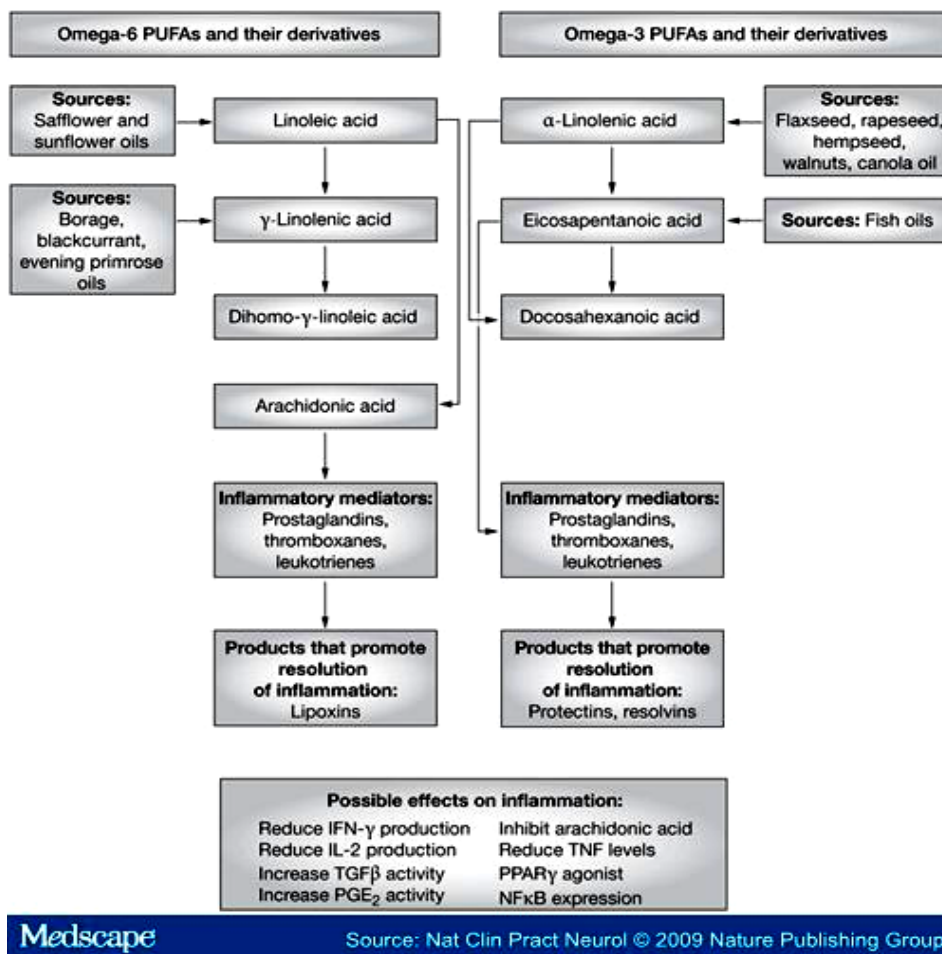
Todas as membranas são constituídas por um grande número de lípidos, proteínas, complexos lipo-proteicos, glicolípidos e glicoproteínas (Berdanier, 2008). A proporção desses constituintes varia com o tipo de membrana. Por exemplo, a membrana mitocondrial é mais rica em proteínas que em lípidos e a membrana das células nervosas (mielina) é o oposto, contendo mais lípidos que proteínas (Hames & Hooper, 2005).

Nas membranas animais os derivados lipídicos com maior expressão são os glicerofosfolípidos, os esfingolípidos e os esteróis (maioritariamente o colesterol) (Hames & Hooper, 2005).

⁴ Este valor, foi obtido através de marcadores com isótopos, e diz respeito ao fluxo através da via metabólica e não uma alteração na massa final do indivíduo.

O glicerofosfolípido é constituído por 3 subunidades: uma cabeça fosforilada, um esqueleto tricarbonado e um grupo glicerol e duas cadeias de ácidos gordos hidrocarbonados (Ilustração 11).

Ilustração 9 – n-6 e n-3 PUFAs e seus respectivos metabolismos e origens. Depois da ingestão, os PUFAs são metabolizados por várias vias (não ilustrado) até originarem os mediadores da inflamação e produtos que actuam na resolução da inflamação. Os possíveis efeitos na inflamação estão listados na caixa do fundo. Abreviaturas: IFN – Interferão; IL – Interleucina; NF – factor nuclear; PG – Prostaglandinas; PPAR – receptor activador-proliferador do peroxissoma; TGF – Factor de transformação do crescimento; TNF – Factor de Necrose Tumoral.



O Esfingolípido na sua estrutura difere do glicerofosfolípido no esqueleto carbonado, em que o glicerol é substituído pela esfingosina (Ilustração 13). O esfingolípido mais comum é a esfingomiéline que está em maiores concentrações na bainha de miéline das células nervosas. Outro esfingolípido, quase exclusivo das membranas das células nervosas, é o Galactocerebrosido. Outro que é particularmente abundante nas células nervosas é o gangliosido (Hames & Hooper, 2005), podendo atingir 6% dos lípidos totais do cérebro (Voet & Voet, 1995). Desempenha um papel fundamental no reconhecimento célula-célula e

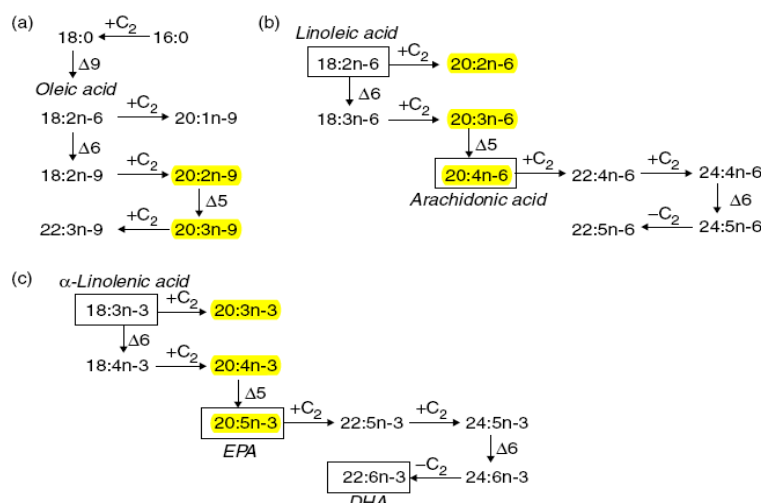
provavelmente tem uma função importante no crescimento e diferenciação de tecidos, bem como na carcinogénese (Voet & Voet, 1995) e na doença de Tay-Sachs⁵.

O colesterol, esteróide mais abundante nos animais (Voet & Voet, 1995), é um composto isoprenóide com quatro anéis fundidos (ciclopentanoperihidrofenantreno), uma cadeia alifática e um grupo hidroxil (Zubay, Parson, & Vance, 1995) (Ilustração 12). Ocorre nas membranas em duas formas: livre ou esterificado com uma cadeia longa de ácidos gordos (LCFA), influenciando directamente a rigidez da membrana: maiores quantidades levam a uma maior rigidez.

É também um precursor de hormonas esteróides, como as sexuais e as do metabolismo dos hidratos de carbono.

Como a constituição dos lípidos de membrana não é estática, isto é, é possível através da ingestão de PUFA's alterar a constituição dos AG dos glicerofosfolípidos de membrana, como foi demonstrado nas membranas de eritrócitos por Bandarra, Monteiro, Martínez, Kiely, e Thorsdottir (2007) ou, no sentido contrário, a sua ausência causar efeitos deletérios como é o caso da carência em DHA originar a redução da acuidade visual e deficiências na aprendizagem (Horrocks & Farooqui, 2004), é necessário garantir um aporte de lípidos moderado, com uma razão n-6/n-3 equilibrada.

Ilustração 10 – Conversão dos AG da dieta para PUFA's de cadeia longa, através de dessaturação e alongamento e precursores dos eicosanoides (a amarelo), por 3 vias: (a) via activada em caso de carência alimentar; (b) via da síntese do n-6; (c) via da síntese dos n-3 (Klurfeld, 2008) .



⁵ Doença genética autossómica recessiva que provoca um aumento da concentração de gangliosídeo no organismo, em especial nas células nervosas, por deficiência da enzima Hexosaminidase A, provocando uma falência gradual do sistema nervoso.

Ilustração 11 – Vários exemplos de glicerofosfolípidos *in* (Hames & Hooper, 2005)

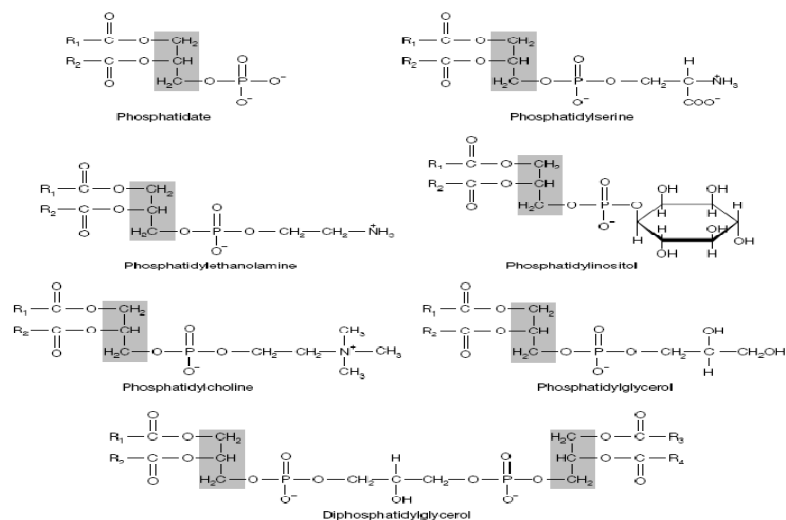


Fig. 1. Structures of membrane **glycerophospholipids**. R_1 and R_2 represent hydrocarbon chains of fatty acids.

Ilustração 12 – Estrutura carbonada numerada do colesterol (Nelson & Cox, 2000)

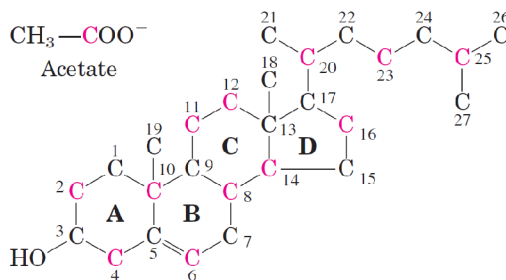


Ilustração 13 – Estrutura da esfingomielina, da galactocerebroside (a) e do colesterol (b) *in* (Hames & Hooper, 2005)

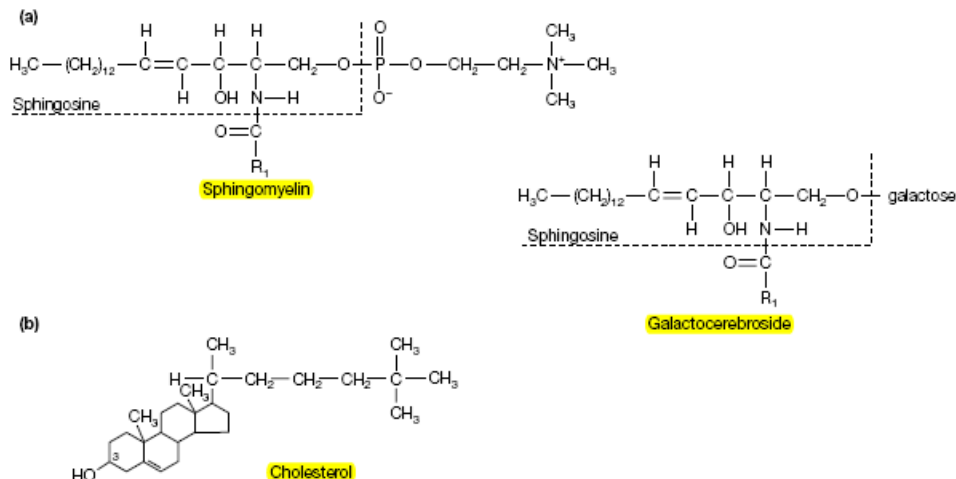


Fig. 2. Structures of (a) the sphingolipids sphingomyelin and galactocerebroside; (b) cholesterol. R_1 represents the hydrocarbon chain of fatty acids.

1.6 – O Sistema Nervoso Humano e a importância do óleo de peixe

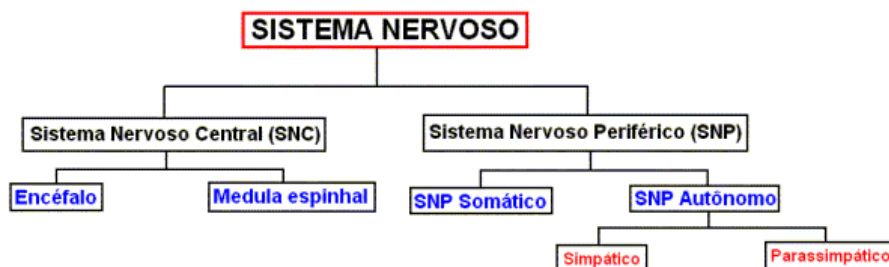
No Homem o Sistema Nervoso é constituído por dois sistemas distintos: o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Ilustração 14).

O cérebro (Encéfalo) tem uma função que mais nenhum outro órgão/sistema tem, que é o “Potencial Intelectual”, que resulta do somatório da inteligência e da memória (Molina, 2002) conseguidas através da concentração de neurónios, 50 a 100 biliões, e, sobretudo, das sinapses entre si. Anatomicamente o cérebro tem duas zonas: o córtex (cinzenta), maioritariamente constituída por corpos celulares do neurónio, e a zona branca, constituída essencialmente pelos axónios e pelas dendrites, que por serem ricas em mielina conferem a cor branca.

Podemos assim resumir a constituição do Sistema Nervoso (SN) em três tipos de estruturas:

- O Neurónio: Célula especializada na integração e emissão de impulsos nervosos. É constituído por um corpo celular, que contém o núcleo e os organelos celulares, as dendrites, que recebem o estímulo de outros neurónios através das sinapses e um axónio, que é o prolongamento da célula por onde o estímulo eléctrico é enviado para a sinapse (Ilustração 15). Para que este estímulo eléctrico se propague rapidamente e sem interrupção até à sinapse, este é revestido pela bainha de mielina, que no SNP é formada pelas células de Schwann e no SNC por células chamadas oligodentrócitos;
- A Neuroglia: células com funções metabólicas e estruturais do SN;
- Fibras Nervosas: Vários axónios unidos e envolvidos por mielina.

Ilustração 14 – Esquema do Sistema Nervoso *in* (Vilela)



A bainha de mielina tem como constituintes principais os fosfolípidos (30%), os esteróis (colesterol) (19%), e as Proteínas (30%). A sua função é garantir uma condução intercalada de iões entre os nódulos de Ranvier (Ilustração 15) para que a velocidade de propagação do potencial de acção seja elevada e haja economia de energia para a célula, pois só os nódulos de Ranvier são despolarizados e não toda a membrana. A sua falta ou deficiência estrutural origina alterações na condutividade e logo patologia associada, como é o caso da Esclerose múltipla. As proporções de AA e DHA na bainha de mielina são inferiores às encontradas nas membranas sinápticas (Farooqui, 2009), no entanto a importância destes AG pode ser indirecta, já que os eicosanóides, mais propriamente o Tromboxano A2,

modula a produção da MBP (Proteína básica da mielina) em ratinhos (Ramamurthy, Mir, Gould, & Breton, 2006).

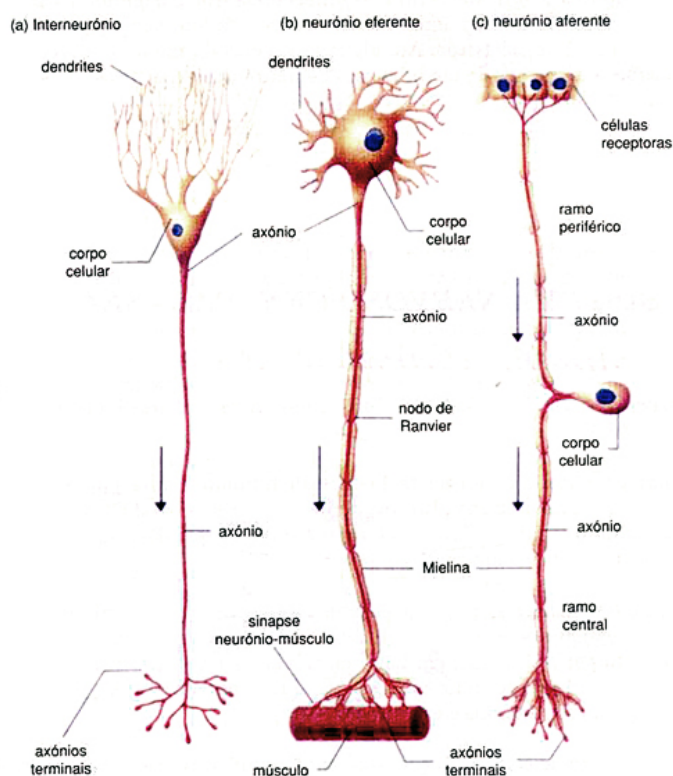
O sistema nervoso central é constituído por milhões de sinapses que regulam a transmissão de informação entre neurónios no cérebro. A maior ou menor incorporação de EPA e DHA, especialmente nas membranas sinápticas, altera a fluidez da membrana, a sua permeabilidade e viscosidade (Farooqui, 2009). Assim, a incorporação destes AG têm a capacidade de modular: a neurotransmissão, a expressão genética, a actividade enzimática e dos receptores, os canais iónicos e a imunidade (Farooqui, 2009). Segundo Calon e Cole (2007) o DHA representa entre 12 a 16% dos ácidos gordos do córtex cerebral e a sua fonte principal advém da dieta, logo, os seus níveis podem ser significativamente alterados consoante o seu aporte na dieta.

Ilustração 15 – Três tipos de neurónios *in* <http://www.filosofia.com.pt/disciplinas/cerebro.html>

www.filosofia.com.pt

O Neurónio

3 tipos: interneurónio, eferente e aferente



Na generalidade os PUFA n-3 têm uma acção protectora do cérebro contra o declínio cognitivo em pessoas idosas. Pensa-se que este efeito esteja relacionado com a

manutenção da estabilidade e integridade das sinapses que modulam a neurotransmissão (Farooqui, 2009).

Hamazaki (2006) concluiu que a administração de óleo de peixe à dieta permite baixar a agressividade em jovens adultos em crianças com défices em atenção e distúrbios relacionados com hiperactividade e em crianças femininas em idade escolar.

Segundo Simopoulos (2009) o DHA é essencial para o desenvolvimento da retina e do cérebro, principalmente em bebés prematuros e que uma razão n-6/n-3 equilibrada é essencial para o crescimento e desenvolvimentos normal das crianças, diminuindo a prevalência de patologias cardiovasculares, doenças crónicas e aumentando a “performance” mental.

1.7 – O Músculo e a importância do óleo de peixe

As membranas celulares do músculo refletem as alterações dos AG ingeridos na dieta como está evidente na modificação da composição dos fosfolípidos no músculo, rim e fígado de ratos alimentados com óleo de sardinha, rico em EPA e DHA (Bandarra, et al., 1997).

Uma alimentação rica em DHA e EPA implica alterações nos fosfolípidos das membranas do músculo cardíaco, com efeitos protectores de arritmias (Farooqui, 2009), diminui a formação de trombos pela inibição da adesão de leucócitos e da reacção plaquetária (Kristensen, Iversen, & Schmidt, 2001).

Na perspectiva de produção animal, este conceito de controlo dos ácidos gordos presentes nas massas musculares começa a ser explorado, já que é desejável que a razão n-6/n-3 das dietas da população Ocidental, próximo dos 15-17:1 (Alfaia, et al., 2009), seja alterado para níveis mais próximos dos nossos ancestrais, 1-2:1 (Simopoulos, 2009).

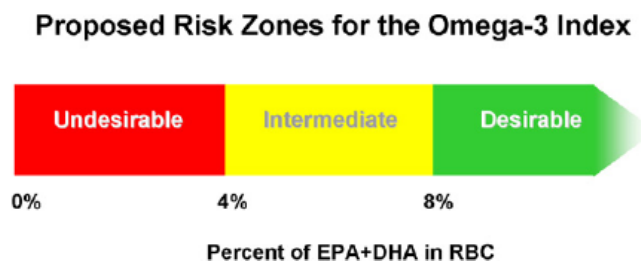
1.8 – O sangue como indicador de risco de Doenças Cardiovascular

A variação dos ácidos gordos das membranas dos eritrócitos consoante o tipo de dieta têm sido estudada com o intuito de se conseguir, através da colheita de sangue, atribuir um nível de risco de doença cardiovascular.

Gian Luigi Russo (Russo, 2009) menciona vários estudos que demonstram os benefícios de dietas com razões n-6/n-3 próximas de 1 na prevenção de doenças cardiovasculares. Menciona também que a diminuição da razão AA (20:4n-6)/EPA (20:5n-3) é benéfica devido à produção de prostaglandinas da série 3 que tem uma acção anti-inflamatória menos potente e com propriedades que diminuem a agregação plaquetária e a vasoconstricção.

Harris e Schacky (2007) propuseram o “omega-3 index” que corresponde à percentagem de EPA+DHA no total de AG dos eritrócitos. Afirmam que valores inferiores a 4% correspondem a um risco acrescido de doença cardiovascular, como é possível visualizar na Ilustração 16.

Ilustração 16 – Zonas de risco propostas para o índice ómega-3 por Harris e Schacky (2007)



2 - Trabalho Experimental

2.1 – Dietas

Com o intuito de comparar o efeito de concentrações crescentes de sardinha em conserva, com e sem tomate, na deposição de ácidos gordos no cérebro e músculo de rato, foram formuladas 6 tipos de rações isocalóricas, evidenciadas na Tabela 5:

- S – Dieta Controlo, constituída por uma base de soja, 0% de sardinha e 0% de tomate;
- SL – Dieta Controlo com tomate, constituída por uma base de soja, 0 % de sardinha e 15% de tomate.
- F1 – Dieta constituída por 11% de sardinha e 0% de Tomate.
- F2 – Dieta constituída por 22% de sardinha e 0% de Tomate.
- F1L – Dieta constituída por 11% de sardinha e 15% de Tomate.
- F2L – Dieta constituída por 22% de sardinha e 15% de Tomate.

A composição química da sardinha em conserva adicionada às dietas está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição química da Sardinha em conserva utilizada na formulação das várias dietas.

| | % | DP |
|----------|-------|------|
| Humidade | 56,29 | 0,07 |
| Cinza | 3,47 | 0,01 |
| Proteína | 22,18 | 0,20 |
| Gordura | 17,40 | 0,17 |
| Total | 99,33 | |

2.2 – População Estudada

A população estudada era constituída por 54 Ratos Wistar, machos, entre os 21 e 24 dias de idade, com peso entre as 167,7g e as 217,7g. Foram divididos em 6 grupos, cada um com 9 elementos. Cada grupo foi alimentado *ad libitum*, durante 10 semanas, com diferentes dietas: S, SL, F1, F2, F1L e F2L. A cada grupo foi atribuída a designação da dieta administrada: S, SL, F1, F1L e F2L, respectivamente.

2.3 – As Amostras

No final das 10 semanas, os animais foram sacrificados e o cérebro e músculo (*longissimus dorsi*) dissecados e o sangue colhido (via intra-cardíaca). As amostras foram armazenadas congeladas a -80°C até serem processadas.

O tratamento das amostras de sangue, devido às suas propriedades diferentes, após a sua colheita seguiu os seguintes passos para separação dos eritrócitos, antes da congelação:

1. Adicionar 5ml de sangue a um tubo teste heparinizado;
2. Separação do plasma por centrifugação a 700 g (2500 rpm) durante 10 minutos;
3. Descartar o plasma resultante.

Tabela 5 – Tabela de ingredientes das 6 dietas formuladas em % (w/w) (tabela fornecida pela empresa que efectuou a mistura das rações)

| Ingredientes/Dieta | S | SL | F2 | F2L | F1 | F1L |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | % | % | % | % | % | % |
| Caseína | 20,00 | 18,80 | 5,25 | 4,05 | 12,60 | 11,40 |
| Amido de milho | 37,85 | 24,00 | 39,50 | 25,60 | 38,70 | 24,80 |
| Maltodextrina | 13,20 | 13,20 | 13,20 | 13,20 | 13,20 | 13,20 |
| Sucrose | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 10,00 |
| Celulose | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Óleo de soja | 8,90 | 8,95 | 0,00 | 0,10 | 4,45 | 4,55 |
| L-Cistina | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 |
| Mineral mix, (AIN-93G-MX) | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| Vitamin mix, (AIN-93-VX) | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Colina bitartrato | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| TBHQ (antioxidante) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Sardinha em conserva | 0,00 | 0,00 | 22,00 | 22,00 | 11,00 | 11,00 |
| Tomate em pó | 0,00 | 15,00 | 0,00 | 15,00 | 0,00 | 15,00 |
| Total | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

2.4 – Análises Bioquímicas

Foram realizados dois tipos de análises bioquímicas: de determinação do perfil dos Ácidos gordos e de determinação da composição química. A determinação do perfil de ácidos gordos foi efectuada às dietas e às amostras de cérebro, músculo e eritrócitos. Enquanto a determinação da composição química foi feita exclusivamente à amostra de sardinha em conserva.

2.4.1 – Determinação do Perfil de Ácidos Gordos

O perfil de Ácidos Gordos foi determinado por cromatografia de fase gasosa, utilizando o método de Lepage e Roy (1986), modificado por Cohen, Shak, & Richmond (1988). Este método consiste na trans-esterificação dos ácidos gordos dos fosfolípidos, em ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME – Fatty Acid Methyl Esters) através de catálise ácida.

Começou-se por pesar aproximadamente 350mg ou 150mg de amostra liofilizada, consoante fosse músculo ou cérebro, respectivamente, para tubos de centrifugação previamente identificados e tarados com capacidade de 15ml. Adicionou-se a cada tubo 5ml de mistura de cloreto de acetilo e metanol, numa proporção de 1:19 e agitaram-se os tubos no vortex. De salientar que, por se tratar de uma reacção exotérmica, esta mistura foi feita em Hotte, numa tina com gelo, adicionando a mistura gota a gota junto das paredes do copo. Os tubos foram, então, colocados em banho-maria a 80°C durante 1 hora. Terminado, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente, adicionou-se 1 ml de água mili-Q⁶ e 2 ml de n-heptano e agitou-se novamente no vortex e deixada a repousar de modo a haver separação das fases. Recolheu-se a fase orgânica de cada tubo, a qual foi filtrada para um vial, através de coluna de algodão e sulfato de sódio anidro. Por fim, injectou-se 2 µl de cada amostra num cromatógrafo gás/líquido, Varian CP-3800 com FID. A separação foi efectuada numa coluna capilar de sílica fundida OMEGAWAX (30 mX0.25 mm IDX0.25µm), utilizando hélio como gás de arraste. A temperatura do injector e do detector foram mantidas constantes nos 250°C durante os 40 minutos da análise. A coluna foi sujeita a uma rampa térmica de 4°C.min⁻¹ iniciando-se nos 180°C durante 5 minutos e acabando nos 220°C durante 25 min. Os cromatogramas obtidos forneceram a percentagem de cada ácido gordo presente na amostra, bem como, os tempos de retenção por comparação a padrões previamente identificados que se encontram numa *peak table* no software da Varian.

Material Usado:

- Balança AG 245 Mettler Toledo
- Agitador vortex, Heidolph Reaxo Control
- Centrifuga Sigma modelo 2K15B. Braun

⁶ Água desionizada

- Banho Termostatizado, Kotterman 3047
- Evaporador de azoto Racti PIERCE-Van III
- Cromatógrafo em fase gasosa Varian CP-3800 Gas Chromatograph (USA) equipado com um auto-amostrador e um detector de ionização de chama (FID) a 250°C. Na separação usou-se hélio como gás de arraste e uma coluna capilar de polietilenoglicol OMEGAWAX com 30m de comprimento, 0,32 mm d.i, 0,25 µm de espessura de filme da J&W Scientific.

Reagentes:

- Solução metanólica de cloreto de acetilo a 5%
- Sulfato de sódio anidro – 99,9%
- Água milli-Q
- N-heptano – 99%

Os FAME foram identificados pela análise de cromatogramas, comparando-os com os respectivos tempos de retenção dos padrões da Sigma. As áreas dos picos foram obtidas recorrendo a um software da *Varian* e os valores expressos em % relativa.

2.4.2 – Composição química da sardinha em conserva das dietas

Para a determinação da composição química da sardinha em conserva adicionada nas dietas formuladas, foram utilizados os seguintes métodos:

2.4.2.1 – Gordura livre Total

Para a determinação da gordura livre total foi usada a norma NP 1972 (1992), com recurso ao aparelho de *Shoxlet* para extracção. Este método de quantificação de gordura baseia-se na extracção da matéria gorda de uma amostra húmida, efectuando-se várias lavagens sob refluxo com éter etílico. De seguida, o solvente é eliminado por evaporação e secagem. Cada amostra foi analisada em duplicado e o procedimento descrito a seguir.

Para determinar o teor em gordura, pesaram-se 5 g de cada amostra húmida para um almofariz, previamente identificado e tarado, e adicionou-se igual quantidade de sulfato de sódio anidro, triturado e homogeneizado com o auxílio de um pilão. Depois, transferiu-se cada amostra para dois papéis de filtro e fez-se uma cartuxa bem apertada de forma a envolver todo o material biológico, colocando-se em seguida dentro de tubos extractores. Simultaneamente, colocou-se alguns balões volumétricos de fundo raso numa estufa a 105°C durante 1 hora para eliminar alguma humidade existente. Após o arrefecimento em excicador, pesagem e identificação dos balões, adicionou-se 80 ml de éter etílico e montaram-se os tubos que continham as cartuxas juntamente com os balões. Perfez-se o volume com éter etílico até a Cartuxa estar completamente submersa neste solvente. Cada

conjunto extractor com cartuxa + balão foi colocado num aparelho de *Soxhlet* (bateria de placas *P Selecta*), no qual permaneceu em placa de aquecimento durante um período de 7 horas. No final deste tempo, extraiu-se o éter por evaporação em placa quente e secaram-se os balões numa estufa a 105°C durante 30 minutos. Transferiram-se os balões com gordura para um excicador onde se deixou arrefecer até à temperatura ambiente e pesou-se registando o valor. Repetiu-se este passo até se atingir peso constante e calculou-se o teor de gordura com base na fórmula:

$$\text{Teor gordura (\%)} = \frac{(\text{massa do balão com gordura (g)} - \text{massa do balão (g)})}{\text{massa amostra húmida (g)}} \times 100$$

2.4.2.2 – Proteína Bruta

A proteína bruta foi determinada com base no método de *Kjeldahl* (AOAC, 1995). Este método consiste numa hidrólise em meio ácido das amostras húmidas e posterior quantificação do teor de azoto total por destilação e titulação. Usando um factor de conversão de 6,25. Cada amostra foi analisada em duplicado e o procedimento encontra-se descrito a seguir.

Inicialmente, cortou-se uma folha de papel vegetal em quadrados com cerca de 5cm². Nestes pesou-se 0,5g de cada amostra húmida e registou-se o valor. Dobrou-se cada pedaço de papel vegetal contendo a amostra e colocou-se dentro dos tubos de *Kjeldahl*, previamente identificados. Adicionou-se a cada tubo uma pastilha catalisadora (3,5g sulfato de potássio + 3,5mg de selénio) e 10ml de ácido sulfúrico (95-97%) e em seguida transferiram-se os tubos para aparelho de digestão de proteína (*Digestion System 20 – 1015*). Também se prepararam brancos, isto é, alguns tubos que continham apenas a pastilha catalisadora e o ácido sulfúrico. O processo de digestão consistiu em deixar as amostras durante 15 minutos a 310°C e depois aumentar para 450°C, temperatura à qual permaneceram durante 60 minutos. Finda a digestão da proteína, retiram-se os tubos e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Por fim, analisou-se e quantificou-se o teor em azoto utilizando um aparelho de destilação (*Velp Scientifica UDK 152 – Destilator & Titration*) de acordo com as suas instruções, que forneceu a percentagem de proteína presente em cada amostra com base num factor de conversão igual a 6,25.

2.4.2.3 – Humidade e Cinza

A determinação da humidade e cinza foi realizada de acordo com a norma NP 2282 (1991). Neste método, a humidade é determinada após secagem e pesagem das amostras até massa constante, registando-se a perda em grama. Para a determinação da cinza, as amostras anteriormente secas e pesadas, foram sujeitas a uma temperatura de 500°C, durante uma noite, registando-se no final a perda de massa, em grama. Cada amostra foi analisada em duplicado através do seguinte procedimento:

Colocaram-se os cadinhos, previamente identificados, numa estufa a 100°C durante cerca de uma hora. Ao fim deste tempo, os cadinhos foram transferidos para um excicador, onde arrefeceram até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, tirou-se a tara dos cadinhos e pesou-se 10g de amostra húmida, registando o valor. Os cadinhos com a amostra húmida foram depois colocados numa estufa a 100°C, durante uma noite. Por fim, retiraram-se os cadinhos da estufa, deixando-se arrefecer em excicador até atingirem a temperatura ambiente. Pesou-se a amostra seca, registou-se o valor e calculou-se o teor em humidade utilizando a fórmula:

$$x = \frac{[\text{massa cadinho com amostra húmida (g)} - \text{massa do cadinho com amostra seca (g)}]}{[\text{massa do cadinho com amostra húmida (g)} - \text{massa do cadinho (g)}]} \times 100$$

Para a determinação do teor em cinza, utilizaram-se os cadinhos com a amostra seca que foram colocados numa mufla previamente aquecida a 200°C. A temperatura da mufla foi depois aumentada gradualmente, até se atingir 500°C (aumentou-se 50°C de 30 em 30 minutos, excepto nos períodos correspondentes à passagem de 300 a 350°C e de 350-400°C nos quais se aumentou a temperatura de 1 em 1 hora). Uma vez atingidos os 500°C, deixaram-se as amostras na mufla durante uma noite. Findo este período transferiram-se os cadinhos para um excicador, onde arrefeceram até à temperatura ambiente e pesou-se o conjunto cadinho + cinza. Este último passo foi repetido 3 a 4 vezes até o peso começar a subir. Para o cálculo do teor em cinza escolheu-se o valor mais baixo e recorreu-se à fórmula:

$$x = \frac{[\text{massa cadinho com cinza (g)} - \text{massa do cadinho (g)}]}{[\text{massa do cadinho com amostra húmida (g)} - \text{massa do cadinho com cinza (g)}]} \times 100$$

2.5 – Tratamento estatístico

Os resultados apresentam a sua média e desvio padrão associados a cada grupo estudado. No tratamento estatístico foi utilizado o software PASW Statistics 18, para um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), utilizando a Comparação de médias ONE-WAY-ANOVA e o teste de Tukey como “post hoc”, para um nível de significância de $p < 0,05$. Para avaliação do efeito dos factores Óleo de sardinha, Tomate e a sua interacção na deposição dos ácidos gordos nos tecidos estudados utilizou-se a comparação de médias com o Two-way-ANOVA para um nível e significância de $p \leq 0,05$. A análise de regressão efectuou-se com recurso à estimação das curvas de regressão (R^2), utilizando o teste ANOVA para a obtenção de um nível de significância, $p < 0,05$.

3 – Resultados e Discussão

3.1 Perfil de ácidos gordos nas dietas

A análise da Tabela 6 apresenta o perfil dos ácidos gordos das 6 dietas estudadas.

As dietas controlo, S e SL, compostas por óleo de soja, apresentavam um teor mais elevado de PUFA do que as restantes. Este teor elevado justifica-se pelos maiores níveis de EFAs: LA – Ácido Linoleico (18:2n-6) e ALA – Ácido α -Linolénico (18:3n-3), já que não contêm DHA (22:6n-3) nem EPA (20:5n-3).

A introdução de concentrações crescentes de sardinha nas dietas originou um aumento gradual do teor de AG n-3, influenciado principalmente pelo DHA e pelo EPA (ver Tabela 6). Este aumento de AG n-3 reflectiu-se no aumento da razão n-3/n-6⁷, contribuiu também para este aumento a diminuição do LA (18:2n-6).

Tabela 6 – Composição, em % dos AG totais, dos ácidos gordos das diferentes dietas: S, SL, F1, F2, F1L e F2L (espaços vazios correspondem a valores inferiores ao limite de detecção).

| Amostra / % | S | F1 | F2 | SL | F1L | F2L |
|------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| 14:0 | 0,57 | 1,88 | 4,10 | 0,67 | 2,00 | 4,22 |
| 15:0 | 0,00 | 0,20 | 0,40 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 16:0 palmitico | 12,63 | 14,50 | 18,50 | 12,17 | 15,00 | 19,19 |
| 16:1n-9+n-7 | 0,00 | 1,35 | 3,29 | 0,00 | 1,43 | 3,45 |
| 16:0 iso | 0,00 | 0,00 | 0,5 | 0,00 | 0,00 | 0,53 |
| 16:2n-4 | 0,00 | 0,00 | 0,4 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 17:0 | 0,00 | 0,00 | 0,6 | 0,00 | 0,00 | 0,59 |
| 16:4n-3 | 0,00 | 0,00 | 0,59 | 0,00 | 0,00 | 0,46 |
| 18:0 esteárico | 4,30 | 4,50 | 4,45 | 4,30 | 4,39 | 4,31 |
| 18:1 | 23,06 | 21,56 | 18,12 | 23,39 | 21,42 | 17,61 |
| 18:2n-6 LA | 51,27 | 38,84 | 17,6 | 52,30 | 41,13 | 17,47 |
| 18:3n-3 ALA | 4,96 | 3,83 | 2,84 | 4,55 | 3,48 | 2,94 |
| 18:4n-3 | 0,00 | 0,93 | 2,54 | 0,00 | 1,01 | 2,48 |
| 20:0 | 0,00 | 0,54 | 0,87 | 0,00 | 0,51 | 0,87 |
| 20:1 | 0,00 | 0,87 | 1,75 | 0,00 | 0,65 | 1,57 |
| 20:2n-6 | 0,00 | 0,00 | 0,28 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 20:4n-6 | 0,00 | 0,19 | 0,41 | 0,00 | 0,00 | 0,49 |
| 20:4n-3 | 0,00 | 0,38 | 1,01 | 0,00 | 0,00 | 1,04 |
| 20:5n-3 EPA (mg/g) | 0,00 (0,00) | 3,42 (1,59) | 8,59 (3,41) | 0,00 (0,00) | 3,27 (1,55) | 9,21 (2,67) |
| 22:5n-3 | 0,00 | 0,40 | 0,92 | 0,00 | 0,36 | 0,93 |
| 22:6n-3 DHA (mg/g) | 0,00 (0,00) | 4,29 (1,99) | 10,44 (4,15) | 0,00 (0,00) | 4,00 (1,89) | 10,90 (3,16) |
| Total | 96,78 | 97,68 | 98,17 | 97,39 | 98,7 | 98,3 |
| Saturados | 17,50 | 21,62 | 29,51 | 17,14 | 21,90 | 29,70 |
| Monoinsaturados | 23,06 | 23,78 | 23,16 | 23,39 | 23,51 | 22,63 |
| Polinsaturados | 56,22 | 52,29 | 45,57 | 56,85 | 53,25 | 45,92 |
| n-3 | 4,96 | 12,85 | 26,01 | 4,55 | 11,77 | 27,04 |
| n-6 | 51,27 | 39,04 | 18,26 | 52,30 | 41,13 | 17,96 |
| n-3/n-6 | 0,10 | 0,33 | 1,42 | 0,09 | 0,29 | 1,51 |
| AG essenciais % (mg/g) | 56,22 (34,53) | 42,67 (19,78) | 20,41 (8,09) | 56,85 (33,51) | 44,61 (21,07) | 20,41 (5,92) |
| EPA + DHA (mg/g) | 0,00 | 3,57 | 7,56 | 0,00 | 3,43 | 5,83 |

Este aumento da razão n-3/n-6 deve-se essencialmente aos valores elevados de 22:6n-3 (DHA) e 20:5n-3 (EPA) presentes no óleo da sardinha (Tabela 1).

⁷ Daqui em diante opta-se pela razão n-3/n-6 em detrimento da n-6/n-3, para um melhor percepção dos dados obtidos na incorporação dos AG nos tecidos. Razão de n-6/n-3 de 2:1 é igual a razão n-3/n-6 de 0,5.

3.2 Evolução do peso dos ratos

A evolução dos pesos dos ratos não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados (S, SL, F1, F1L, F2 e F2L), para $p < 0,05$, nos parâmetros Peso Inicial, Peso Final (após 12 horas de jejum), GMD⁸ (Ganho Médio Diário) e “Food Efficiency”⁹ confirmando-se que as várias dietas são isocalóricas (Gráfico 1 e Tabela 7).

Tabela 7 – Valores do nível de significância do teste ONE-Way- ANOVA, para as 6 variáveis analisadas. Os níveis de significância apresentados demonstram que não há diferenças entre as médias dentro de cada variável, $p < 0,05$,

| Parâmetro | Nível Significância |
|---------------------------|---------------------|
| Peso Inicial | 1 |
| Peso Final após 12h Jejum | 0,663 |
| GMD | 0,214 |
| Ingestão diária | 0,242 |
| Ingestão Total | 0,239 |
| Food Efficient | 0,128 |

A Ingestão diária e a Ingestão total também não apresentam diferenças significativas, para um $p \leq 0,05$ (Tabela 7), o que traduz uma distribuição *ad libitum* do alimento e ausência de alterações na ingestão dos diferentes grupos.

Também Bandarra, et al. (1997) e Suzuki, Park, Tamura, e Ando (1998) nos seus estudos não encontraram diferenças significativas no GMD dos ratos alimentados com diferentes tipos de óleos.

A média de ingestão de ração de todos os ratos situou-se nas 20,7g/dia.

3.3 Perfil de Ácidos Gordos nos eritrócitos

O perfil de AGs nos eritrócitos é inserido no âmbito deste trabalho para se compreender como as diferentes dietas o alteram; utilizá-lo como base de comparação para com os perfis de AG do músculo e do cérebro; e confirmar a ingestão correcta da dieta de cada grupo de ratos Wistar.

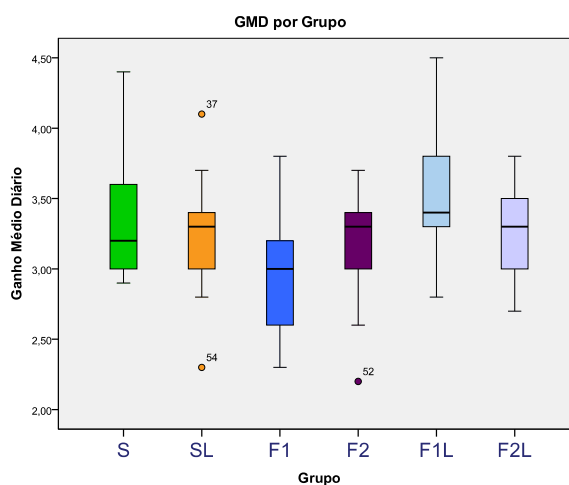
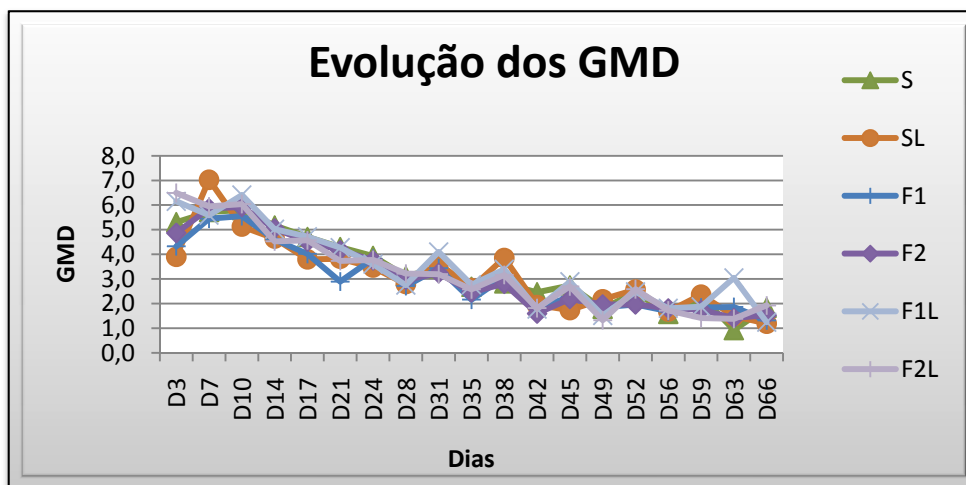
Na (Tabela 9) estão dispostos as percentagens de deposição de AG dos 3 grupos de ratos testados, verifica-se que há alterações significativas ($p < 0,05$) da maioria dos AGs. Nos PUFA identifica-se um decréscimo estatisticamente significativo do $\sum n-6$ e um aumento, também significativo ($p < 0,05$), do $\sum n-3$. Neste último, os AGs EPA e DHA são os principais responsáveis, influenciando directamente a razão $n-3/n-6$ e o índice $n-3$, como demonstrado também por Bandarra et al (2002).

⁸ O GMD é determinado com a seguinte formula, com o “P” a ser o valor do peso (g) e D o dia da pesagem em questão; $GMD = \frac{P_{final} - P_{inicial}}{D_{final} - D_{inicial}}$

⁹ Tradução: Eficiência Alimentar (FE). É determinada com a seguinte fórmula: $FE = \frac{\text{Ganho de peso (g)}}{\text{Dieta ingerida (g)}}$

Verifica-se que o óleo de sardinha é o único a alterar significativamente ($p < 0,05$) a maioria dos AGs dos eritrócitos (Tabela 9), significando que a introdução do factor tomate isolado e em associação com o óleo de sardinha não tem qualquer efeito na deposição de AG nos eritrócitos.

Gráfico 1 - Evolução dos Ganhos Médios Diários (GMD) dos vários grupos ao longo das 10 semanas. Verifica-se no gráfico de linhas (cima) que os grupos apresentaram um GMD semelhante. A caixa de bigodes, em baixo, ilustra as médias dos GMD, muito semelhantes dos 6 grupos, sem diferenças significativas, $p < 0,05$. Grupos de ratos envolvidos no estudo: S – óleo de soja; SL – óleo de soja sem tomate; F1 – 25% de sardinha sem tomate; F2 – 50% de sardinha sem tomate; F1L – 25% de sardinha com tomate; F2L – 50% de sardinha com tomate



De modo a avaliar a deposição dos principais ácidos gordos (AG) das diferentes dietas nos eritrócitos, efectuou-se o cálculo da razão de deposição¹⁰.

Este resultados permitem verificar a variação da deposição de um AG num tecido, tendo em conta o aumento gradual do mesmo AG na dieta.

Verifica-se que as razões de deposição (RD) nos eritrócitos (Tabela 8) do AG DHA são menores que nos outros tecidos, mostrando assim que os eritrócitos têm menor capacidade

¹⁰ A razão de deposição (RD) é calculada: $RD = \frac{\%AG \text{ no Tecido}}{\% AG \text{ na Dieta}}$

de incorporar este AG (Gráfico 2). Também é visível que a RD do DHA com a dieta F2 diminui, não se comportando de forma diferente dos outros dois tecidos, músculo e cérebro (Gráfico 2).

No que respeita à deposição de EPA nos eritrócitos (Gráfico 3), como nos outros tecidos, o aumento deste AG na dieta provoca um aumento significativo, $p < 0,05$, da deposição deste no tecido, significando assim que com 8,59% de EPA na dieta não é suficiente para saturar este tecido.

Estes resultados sugerem que o índice n-3 pode ser elevado recorrendo ao aumento do EPA em detrimento do DHA, já que este último parece saturar rapidamente nos eritrócitos.

Tabela 8 - Média das Razões de Deposição dos principais PUFA nos eritrócitos com respectivos desvios padrão. (* diferença significativa, $p < 0,05$ entre RD F1 e RD F2)

| Eritrócitos | | |
|-------------|-------------|-------------|
| Ácido Gordo | RD F1 | RD F2 |
| 18:2n-6 LA | 0,27*±0,04 | 0,40*±0,05 |
| 18:3n-3 ALA | 0,87±0,98 | 0,98±1,10 |
| 20:4n-6 AA | 84,94*11,84 | 25,34*±2,76 |
| 20:5n-3 EPA | 0,65*±0,17 | 0,73*±0,11 |
| 22:6n-3 DHA | 0,80*±0,37 | 0,43*±0,07 |

Gráfico 2 - Comparação das Razões de Deposição do DHA nos 3 tecidos: Eritrócitos (RBC), Músculo e Cérebro, dos ratinhos alimentados com as dietas F1 e F2

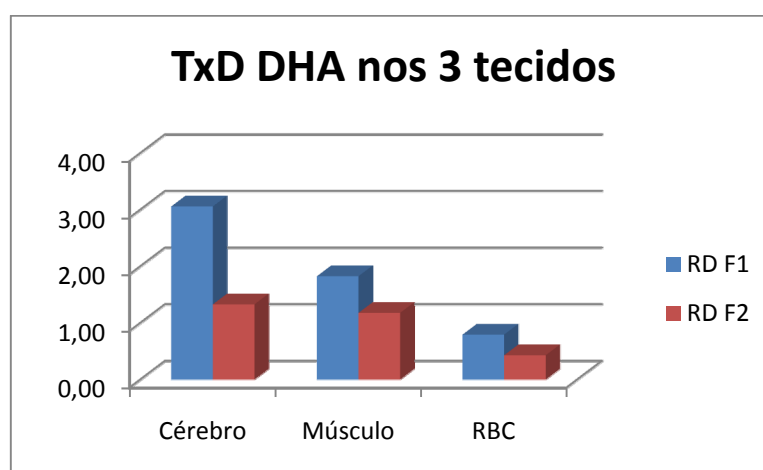
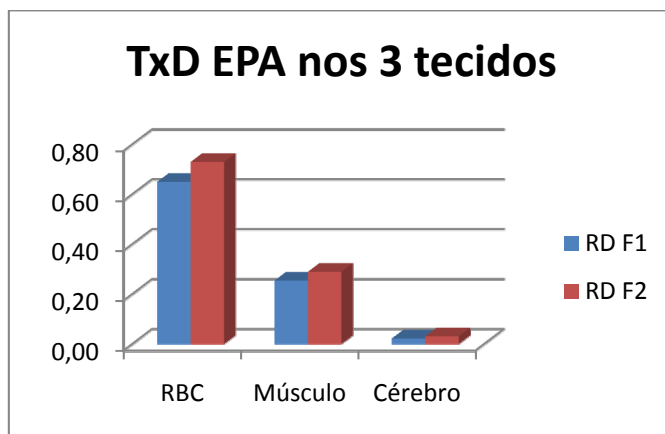


Gráfico 3 - Comparação das Razões de Deposição do EPA nos 3 tecidos: Eritrócitos (RBC), Músculo e Cérebro, dos ratinhos alimentados com as dietas F1 e F2



Partindo deste pressuposto e tendo em conta que os ratos ingeriram 11% (grupo F1) e 22% (grupo F2) de sardinha em conserva por dia e que o homem necessita em média de 2500Kcal/dia e a mulher 2000Kcal/dia. Sabendo que 1 Lata de sardinha (125g) em conserva em média tem 300Kcal (Bandarra, et al., 2009) (Ramirez, 2009). Pressupondo que o consumo do homem e da mulher é de uma lata de sardinha em conserva por dia, chega-se aos seguintes valores:

- Homem: 12% da sua alimentação/dia é conserva de sardinha
- Mulher: 15% da sua alimentação/dia é conserva de sardinha

Utilizando estes valores e comparando-os com o valor de ingestão de sardinha em conserva dos grupos testados, F1 e F2, e tendo em conta o índice ómega-3 apresentado na Ilustração 16 e na Tabela 9, conclui-se que:

- 1 lata/dia é suficiente para colocar o índice ómega-3 no nível intermédio.
- 2 latas/dia altera o índice ómega-3 para o desejável

Tabela 9 – Percentagem de Ácidos Gordos, e respectivos desvios padrão, nos eritrócitos de ratinhos alimentados com 6 tipos de rações de concentrações crescentes de sardinha (óleo de sardinha) com e sem Tomate. É apresentado também o nível de significância dos factores óleo e tomate e a sua interligação para um $p < 0,05$. (^{a b c} - significativamente diferente dentro de cada factor, óleo ou tomate). Testagem de hipótese com ONE-WAY ANOVA e teste Tukey “Post Hoc” para verificar o nível de significância entre os grupos dentro do mesmo factor. Testagem Two-Way ANOVA para verificar nível significância do efeito óleo, tomate e sua associação ($p < 0,05$) (Σ Polinsaturados: $\Sigma n-3$: 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-3; $\Sigma n-6$: 18:2n-6, 18:3n-6, , 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:5n-6; 16:3n-4, 18:3n-4, 20:3n-9 Σ Monoinsaturados : 16:1n-7+n-9, 16:1n-5, 17:1, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-11, 22:1n-9, 24:1n-9; Σ Saturados: 14:0, 14:0 ISObr, 15:0, Ante-ISO 16:0, 16:0, 17:0 ISObr, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0); n-3 Index = (DHA + EPA)

| | Óleo | | | Tomate | | | Two – way ANOVA | | |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| Ácidos gordos (%) | S | F1 | F2 | SL | F1L | F2L | Óleo | Licopeno | Interacção |
| 14:0 | 0,09 ^a ±0,12 | 0,08 ^a ±0,12 | 0,15 ^a ±0,19 | 0,10 ^a ±0,12 | 0,15 ^a ±0,12 | 0,34 ^b ±0,15 | n.s. | n.s. | 0,039 |
| 15:0 | 0,14 ^a ±0,14 | 0,47 ^a ±0,79 | 0,13 ^a ±0,13 | 0,12 ^a ±0,13 | 0,27 ^a ±0,46 | 0,30 ^a ±0,11 | n.s. | n.s. | n.s. |
| 16:0 AntelISO | 0,05 ^a ±0,06 | 0,04 ^a ±0,07 | 0,10 ^a ±0,10 | 0,07 ^a ±0,09 | 0,07 ^a ±0,08 | 0,11 ^a ±0,07 | n.s. | n.s. | n.s. |
| 16:0 | 25,09 ^b ±4,24 | 20,92 ^a ±3,41 | 24,95 ^b ±2,67 | 21,91 ^a ±4,69 | 22,64 ^a ±4,77 | 28,40 ^a ±6,97 | 0,010 | n.s. | n.s. |
| 17:0 | 0,52 ^a ±0,11 | 0,32 ^a ±0,24 | 0,51 ^a ±0,21 | 0,42 ^a ±0,25 | 0,45 ^a ±0,27 | 0,66 ^a ±0,07 | 0,023 | n.s. | n.s. |
| 18:0 | 16,36 ^b ±2,00 | 14,71 ^{ab} ±1,97 | 13,61 ^a ±1,34 | 16,50 ^a ±2,01 | 15,23 ^a ±1,47 | 14,85 ^a ±0,88 | 0,001 | n.s. | n.s. |
| 20:0 | 0,03 ^a ±0,07 | 0,06 ^a ±0,09 | 0,07 ^a ±0,09 | 0,10 ^a ±0,08 | 0,18 ^a ±0,34 | 0,13 ^a ±0,11 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Σ Saturados | 42,30^a±5,89 | 36,83^a±5,05 | 39,63^a±5,26 | 39,40^a±6,42 | 39,34^a±4,85 | 45,45^a±6,40 | 0,053 | n.s. | n.s. |
| 16:1n7 + n9 | 0,17 ^a ±0,19 | 0,15 ^a ±0,20 | 0,54 ^b ±0,35 | 0,12 ^a ±0,12 | 0,20 ^a ±0,20 | 0,50 ^b ±0,34 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 18:1 n9 | 6,21 ^a ±0,54 | 6,27 ^a ±0,89 | 7,34 ^b ±0,74 | 5,60 ^a ±0,72 | 5,76 ^a ±0,47 | 7,59 ^b ±0,44 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 18:1 n7 | 2,78 ^a ±0,35 | 2,49 ^a ±0,36 | 2,75 ^a ±0,27 | 2,53 ^a ±0,31 | 2,56 ^a ±0,12 | 2,88 ^b ±0,18 | 0,010 | n.s. | n.s. |
| 20:1 n9 | 0,00 ^a ±0,00 | 0,03 ^a ±0,06 | 0,05 ^a ±0,08 | 0,03 ^a ±0,05 | 0,03 ^a ±0,07 | 0,09 ^a ±0,07 | 0,018 | n.s. | n.s. |
| 20:1 n7 | 0,00 ^a ±0,00 | 0,32 ^a ±0,07 | 0,02 ^a ±0,04 | 0,02 ^a ±0,04 | 0,01 ^a ±0,02 | 0,01 ^a ±0,04 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Σ Monoinsaturados | 10,68^a±0,86 | 11,18^a±1,70 | 12,53^b±0,84 | 10,37^a±1,17 | 10,55^a±1,54 | 12,82^b±1,28 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 18:2n-6 LA | 9,52 ^b ±1,06 | 10,47 ^b ±1,42 | 7,05 ^a ±0,83 | 9,75 ^b ±1,27 | 10,93 ^c ±1,00 | 7,94 ^a ±0,37 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 18:3n-3 ALA | 1,77 ^a ±2,55 | 3,34 ^a ±3,74 | 2,80 ^a ±2,32 | 3,14 ^a ±4,16 | 2,05 ^a ±1,94 | 0,88 ^a ±0,88 | n.s. | n.s. | n.s. |
| 20:4n-6 AA | 19,32 ^c ±2,47 | 16,14 ^b ±2,25 | 10,39 ^a ±1,13 | 19,16 ^c ±2,92 | 14,52 ^b ±2,37 | 10,06 ^a ±1,96 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 20:5n-3 EPA | 0,00 ^a ±0,00 | 1,81 ^b ±1,16 | 6,23 ^c ±0,93 | 0,07 ^a ±0,11 | 1,96 ^b ±0,37 | 6,06 ^c ±1,08 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 22:5n-3 | 0,53 ^a ±0,33 | 1,66 ^a ±1,56 | 2,35 ^b ±0,50 | 0,82 ^a ±0,66 | 1,88 ^b ±0,91 | 1,94 ^b ±0,90 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 22:4n-6 | 0,78 ^a ±0,94 | 0,30 ^a ±0,78 | <0,0001 ^a | 0,34 ^a ±0,62 | <0,0001 ^a | 0,30 ^a ±0,91 | n.s. | n.s. | n.s. |
| 22:6n-3 DHA | 1,15 ^a ±0,67 | 3,41 ^b ±1,57 | 4,47 ^b ±0,77 | 1,14 ^a ±0,85 | 3,36 ^b ±0,99 | 4,00 ^b ±1,61 | 0,001 | n.s. | n.s. |
| Σ Polinsaturados | 39,75^a±6,13 | 46,51^b±4,58 | 39,82^a±5,19 | 45,15^b±6,74 | 42,49^b±5,19 | 34,08^a±5,95 | 0,001 | 0,037 | 0,021 |
| $\Sigma n-3$ | 10,14 ^a ±3,85 | 18,72 ^b ±4,34 | 22,96 ^b ±3,78 | 12,61 ^a ±5,31 | 17,50 ^a ±4,06 | 17,25 ^a ±4,00 | <0,001 | n.s. | 0,021 |
| $\Sigma n-6$ | 32,35 ^b ±3,24 | 30,28 ^b ±2,23 | 19,98 ^a ±1,22 | 32,38 ^c ±2,89 | 28,24 ^b ±1,81 | 19,20 ^a ±2,64 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ | 0,31^a±0,10 | 0,62^b±0,16 | 1,15^c±0,15 | 0,39^a±0,16 | 0,62^b±0,14 | 0,89^c±0,12 | <0,001 | n.s. | 0,002 |
| n-3 Index | 1,24 ^a ±0,72 | 5,55 ^b ±2,75 | 11,65 ^c ±1,92 | 1,21 ^a ±0,92 | 5,76 ^b ±1,44 | 10,90 ^c ±2,90 | <0,001 | n.s. | n.s. |

3.4 Perfil de Ácidos Gordos no Músculo

A deposição de AG no músculo tem um comportamento semelhante ao verificado nos eritrócitos.

Sendo o coração constituído por tecido muscular, e as doenças cardiovasculares uma realidade na sociedade actual, os resultados obtidos no tecido muscular mostram como se comporta este tecido face às diferentes dietas.

Na Tabela 13 estão expressos os valores em % dos ácidos gordos totais, quantificados no tecido muscular e respectivos efeitos dos factores tomate e óleo de sardinha.

A adição do óleo de sardinha aos ratinhos origina que o SFA 16:0 sofra um aumento significativo ($p < 0,05$) nos grupos F1 e F2, o que se justifica com o aumento deste AG nas rações administradas (Tabela 6).

Nos MUFA há um aumento significativo ($p < 0,05$), nos AGs 16:1n-7+n-9 no grupo F2 e no 20:1n-9 nos dois grupos, F1 e F2, aumento que também foi registado por Bandarra (1997).

Verifica-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos AG n-6 como o LA, AA e DPA n-6 e do ALA. A diminuição do ALA, PUFA n-3, deve-se à diminuição da sua concentração nas dietas F1 e F2 (Tabela 6).

Há um aumento significativo ($p < 0,05$) dos PUFA n-3 nos diferentes grupos, F1 e F2, para o EPA e DHA, sendo que o DPA n-3 só no grupo F2 é que é estatisticamente diferente de S e F1. Resultados semelhantes foram obtidos por Bandarra (1997).

Estas modificações do perfil de ácidos gordos no tecido muscular levam a uma alteração significativa ($p < 0,05$) na razão n-3/n-6 (Tabela 13), como verificado também por Bandarra (1997).

O efeito do factor tomate no músculo, ao contrário do tecido cerebral, não tem interferência na maioria dos AG, como está demonstrado na Tabela 13. Parece no entanto haver uma influência estatística ($p < 0,05$) ligeira do factor tomate nos MUFA, apesar de nenhum dos valores p ser $< 0,001$.

Verifica-se que os AGs EPA e DHA têm um crescimento mais próximo do quadrático ($p < 0,001$, $R^2 = 0,97$ e $0,73$, respectivamente) do que linear ($p < 0,001$, $R^2 = 0,85$ e $0,69$, respectivamente) para concentrações crescentes destes AGs na dieta (Tabela 11).

A análise de regressão (Tabela 11 e Tabela 12) confirma que o factor tomate tem um efeito muito residual na deposição dos AG no músculo de rato. Verifica-se, comparando a análise de regressão da Tabela 11 e da Tabela 12 uma perda significativa de linearidade de dois

AG: o 18:1n-7 e 18:3n-3. As restantes rectas de regressão mantêm-se idênticas no factor óleo isolado e em conjugação com o factor tomate.

As Razões de Deposição (RD) no músculo dos AG EPA e DHA (), são semelhantes às dos eritrócitos, já que o DHA tem uma diminuição estatisticamente significativa, $p < 0,05$, com a dieta F2 e o EPA pelo contrário, sofre um aumento significativo, $p < 0,05$.

A diferença nos eritrócitos está relacionada com o facto da RD do DHA ser maior neste tecido. Verifica-se no entanto que o DHA tende a depositar-se no tecido adiposo, como é visível na Ilustração 17, quando os outros tecidos se encontram saturados.

Tabela 10 - Média das Razões de Deposição dos principais PUFA no músculo com respectivos desvios padrão. (* diferença significativa, $p < 0,05$ entre RD F1 e RD F2)

| Músculo | | |
|-------------|-------------|------------|
| Ácido Gordo | RD F1 | RD F2 |
| 18:2n-6 LA | 0,67*±0,06 | 0,77*±0,10 |
| 18:3n-3 ALA | 0,33±0,06 | 0,32±0,09 |
| 20:4n-6 AA | 19,11*±5,03 | 7,05*±1,88 |
| 20:5n-3 EPA | 0,25*±0,04 | 0,29*±0,03 |
| 22:6n-3 DHA | 1,83*±0,46 | 1,18*±0,27 |

Ilustração 17 - Gráfico indicador das Razões de deposição do DHA no cérebro, músculo, fígado, eritrócitos e tecido adiposo. Verifica-se que no grupo 3 (correspondente ao grupo F2 neste estudo) há uma mobilização do AG DHA para o tecido adiposo em detrimento dos outros tecidos. In (Bandarra, et al., 2009)

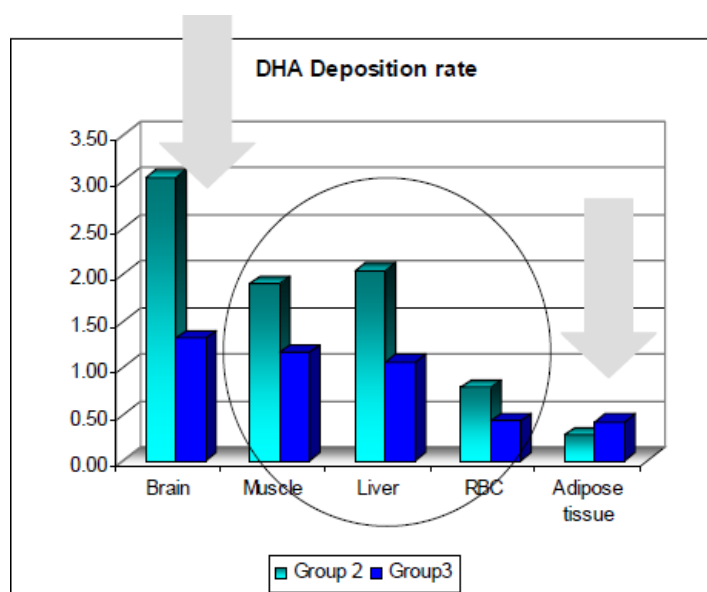


Tabela 11 - Análise de regressão, linear ou quadrática, do factor óleo de sardinha na deposição de ácidos gordos no músculo ($\Sigma n-3$: 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-3; $\Sigma n-6$: 18:2n-6, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:5n-6; 16:3n-4, 18:3n-4, 20:3n-9); n-3 index = (EPA+DHA)

| Ácidos gordos (%) | Óleo | | | Análise de Regressão | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|--------|----------------|--------|
| | S | F1 | F2 | Linear | | Quadrática | |
| | | | | R ² | p | R ² | p |
| 14:0 | 0,95 ^a ±0,13 | 1,44 ^b ±0,18 | 2,07 ^c ±0,35 | 0,75 | <0,001 | 0,80 | <0,001 |
| 15:0 | 0,18 ^a ±0,02 | 0,21 ^{ab} ±0,02 | 0,24 ^b ±0,04 | 0,47 | <0,001 | 0,48 | <0,001 |
| 16:0 AntelSO | 1,03 ^a ±0,33 | 1,15 ^a ±0,23 | 1,37 ^a ±0,48 | 0,13 | 0,068 | 0,15 | 0,150 |
| 16:0 | 18,79 ^a ±1,28 | 22,22 ^b ±0,82 | 25,80 ^c ±1,93 | 0,79 | <0,001 | 0,82 | <0,001 |
| 17:0 | 0,22 ^a ±0,03 | 0,27 ^b ±0,02 | 0,31 ^c ±0,04 | 0,57 | <0,001 | 0,58 | <0,001 |
| 18:0 | 7,73 ^a ±1,83 | 7,71 ^a ±0,92 | 7,67 ^a ±1,34 | 0 | 0,927 | 0 | 0,995 |
| 20:0 | 0,04 ^a ±0,04 | 0,02 ^a ±0,04 | 0,03 ^a ±0,04 | 0,13 | 0,565 | 0,02 | 0,770 |
| Σ Saturados | 29,02 ^a ±2,84 | 33,10 ^b ±1,29 | 37,57 ^c ±2,35 | 0,70 | <0,001 | 0,73 | <0,001 |
| 16:1n7 + n9 | 2,71 ^a ±0,92 | 3,66 ^a ±0,98 | 6,31 ^b ±1,26 | 0,56 | <0,001 | 0,70 | <0,001 |
| 18:1 n9 | 17,20 ^a ±2,92 | 17,73 ^a ±1,88 | 16,38 ^a ±2,66 | 0,01 | 0,620 | 0,05 | 0,532 |
| 18:1 n7 | 2,74 ^a ±0,18 | 2,84 ^{ab} ±0,13 | 3,04 ^b ±0,23 | 0,29 | 0,004 | 0,34 | 0,007 |
| 20:1 n9 | 0,07 ^a ±0,07 | 0,19 ^b ±0,11 | 0,33 ^c ±0,09 | 0,01 | 0,588 | 0,03 | 0,663 |
| 20:1 n7 | 0,16 ^a ±0,11 | 0,21 ^a ±0,13 | 0,18 ^a ±0,09 | 0,56 | <0,001 | 0,60 | <0,001 |
| Σ Monoinsaturados | 23,02 ^a ±3,42 | 24,64 ^a ±2,44 | 26,26 ^a ±3,49 | 0,14 | 0,051 | 0,15 | 0,144 |
| 18:2n-6 LA | 31,17 ^c ±4,16 | 25,89 ^b ±2,24 | 13,59 ^a ±1,68 | 0,74 | <0,001 | 0,88 | <0,001 |
| 18:3n-3 ALA | 1,53 ^b ±0,37 | 1,28 ^b ±0,23 | 0,91 ^a ±0,25 | 0,42 | <0,001 | 0,47 | 0,001 |
| 20:4n-6 AA | 7,42 ^b ±2,44 | 3,63 ^a ±0,95 | 2,89 ^a ±0,77 | 0,62 | <0,001 | 0,64 | <0,001 |
| 20:5n-3 EPA | 0,02 ^a ±0,04 | 0,86 ^b ±0,12 | 2,48 ^c ±0,29 | 0,85 | <0,001 | 0,97 | <0,001 |
| 22:5n-3 DPAn-3 | 1,05 ^a ±0,39 | 1,21 ^a ±0,27 | 1,73 ^b ±0,45 | 0,32 | 0,002 | 0,40 | 0,002 |
| 22:5n-6 DPAn-6 | 0,42 ^b ±0,14 | <0,0001 ^a | <0,0001 ^a | 0,78 | <0,001 | 0,87 | <0,001 |
| 22:6n-3 DHA | 4,01 ^a ±1,55 | 7,83 ^b ±1,99 | 12,29 ^c ±2,87 | 0,69 | <0,001 | 0,73 | <0,001 |
| Σ Polinsaturados | 46,76 ^c ±1,81 | 41,80 ^b ±1,88 | 35,60 ^a ±4,22 | 0,69 | <0,001 | 0,74 | <0,001 |
| $\Sigma n-3$ | 7,43 ^a ±1,84 | 12,01 ^b ±2,20 | 18,86 ^c ±3,42 | 0,72 | <0,001 | 0,79 | <0,001 |
| $\Sigma n-6$ | 39,10 ^c ±2,20 | 29,57 ^b ±1,84 | 16,56 ^a ±1,96 | 0,89 | <0,001 | 0,96 | <0,001 |
| $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ | 0,19 ^a ±0,05 | 0,41 ^b ±0,09 | 1,15 ^c ±0,22 | 0,70 | <0,001 | 0,90 | <0,001 |
| n-3 Index | 4,03 ^a ±1,56 | 8,70 ^b ±2,07 | 14,78 ^c ±3,05 | 0,87 | <0,001 | 0,90 | <0,001 |

Tabela 12 - Análise de regressão, linear ou quadrática, do factor Tomate na deposição de ácidos gordos no músculo
(Σ n-3: 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-3; Σ n-6: 18:2n-6, 18:3n-6, , 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:5n-6; 16:3n-4, 18:3n-4, 20:3n-9); n-3 index = (EPA+DHA).

| Ácidos gordos (%) | Tomate | | | Análise de Regressão | | | |
|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|--------|----------------|--------|
| | SL | F1L | F2L | Linear | | Quadrática | |
| | | | | R ² | p | R ² | p |
| 14:0 | 0,81 ^a ±0,14 | 1,44 ^b ±0,30 | 2,13 ^c ±0,42 | 0,71 | <0,001 | 0,78 | <0,001 |
| 15:0 | 0,17 ^a ±0,02 | 0,22 ^b ±0,03 | 0,27 ^c ±0,05 | 0,54 | <0,001 | 0,58 | <0,001 |
| 16:0 AntelSO | 1,17 ^a ±0,34 | 0,91 ^a ±0,49 | 1,21 ^a ±0,33 | 0,00 | 0,761 | 0,12 | 0,245 |
| 16:0 | 18,38 ^a ±0,82 | 21,50 ^b ±1,07 | 25,31 ^c ±2,49 | 0,69 | <0,001 | 0,78 | <0,001 |
| 17:0 | 0,21 ^a ±0,09 | 0,27 ^{ab} ±0,10 | 0,33 ^b ±0,05 | 0,24 | 0,012 | 0,26 | 0,032 |
| 18:0 | 8,23 ^a ±1,91 | 8,02 ^a ±1,85 | 7,66 ^a ±1,18 | 0,02 | 0,529 | 0,02 | 0,788 |
| 20:0 | 0,04 ^a ±0,04 | 0,05 ^a ±0,05 | 0,07 ^a ±0,05 | 0,07 | 0,184 | 0,09 | 0,352 |
| Σ Saturados | 29,16±2,43 | 32,55 ^b ±1,71 | 37,16 ^c ±3,63 | 0,54 | <0,001 | 0,63 | <0,001 |
| 16:1n7 n9 | 2,28 ^a ±0,94 | 3,30 ^a ±0,91 | 5,33 ^b ±1,28 | 0,48 | <0,001 | 0,62 | <0,001 |
| 18:1 n9 | 16,04 ^a ±2,88 | 15,74 ^a ±3,27 | 14,62 ^a ±1,79 | 0,03 | 0,368 | 0,05 | 0,550 |
| 18:1 n7 | 2,72 ^a ±0,21 | 2,59 ^a ±0,12 | 2,76 ^a ±0,43 | 0,00 | 0,900 | 0,07 | 0,426 |
| 20:1 n9 | 0,09 ^a ±0,05 | 0,27 ^b ±0,05 | 0,38 ^c ±0,06 | 0,03 | 0,367 | 0,16 | 0,246 |
| 20:1 n7 | 0,16 ^a ±0,07 | 0,22 ^a ±0,09 | 0,18 ^a ±0,09 | 0,83 | <0,001 | 0,84 | <0,001 |
| Σ Monoinsaturados | 21,43 ^a ±3,73 | 22,15 ^a ±4,23 | 23,32 ^a ±2,63 | 0,04 | 0,327 | 0,05 | 0,567 |
| 18:2n-6 LA | 30,23 ^c ±3,22 | 26,85 ^b ±2,01 | 13,56 ^a ±1,85 | 0,60 | <0,001 | 0,90 | <0,001 |
| 18:3n-3 ALA | 1,42 ^a ±0,64 | 1,35 ^a ±0,35 | 0,97 ^a ±0,27 | 0,10 | 0,111 | 0,17 | 0,122 |
| 20:4n-6 AA | 7,06 ^b ±1,95 | 3,01 ^a ±1,73 | 2,68 ^a ±0,53 | 0,68 | <0,001 | 0,70 | <0,001 |
| 20:5n-3 EPA | 0,03 ^a ±0,05 | 1,00 ^b ±0,13 | 2,40 ^c ±0,49 | 0,79 | <0,001 | 0,93 | <0,001 |
| 22:5n-3 DPAn-3 | 1,17 ^a ±0,28 | 1,38 ^a ±0,26 | 1,78 ^b ±0,35 | 0,35 | 0,001 | 0,44 | 0,001 |
| 22:5n-6 DPAn-6 | 0,25 ^b ±0,15 | <0,0001 ^a | <0,0001 ^a | 0,63 | <0,001 | 0,67 | <0,001 |
| 22:6n-3 DHA | 4,89 ^a ±2,08 | 8,85 ^b ±3,42 | 11,77 ^b ±2,30 | 0,53 | <0,001 | 0,55 | <0,001 |
| Σ Polinsaturados | 46,92 ^b ±2,50 | 44,46 ^b ±2,79 | 35,09 ^a ±4,47 | 0,48 | <0,001 | 0,72 | <0,001 |
| Σ n-3 | 8,50 ^a ±2,60 | 13,90 ^b ±3,57 | 18,43 ^c ±2,75 | 0,63 | <0,001 | 0,67 | <0,001 |
| Σ n-6 | 38,16 ^c ±2,05 | 29,98 ^b ±2,67 | 16,42 ^a ±2,15 | 0,78 | <0,001 | 0,94 | <0,001 |
| Σ n-3/ Σ n-6 | 0,23 ^a ±0,07 | 0,47 ^b ±0,17 | 1,13 ^c ±0,14 | 0,66 | <0,001 | 0,90 | <0,001 |
| n-3 Index | 4,93 ^a ±2,11 | 9,86 ^b ±3,39 | 14,18 ^c ±2,50 | 0,80 | <0,001 | 0,82 | <0,001 |

Tabela 13 - Disposição da percentagem dos Ácidos Gordos no Músculo de ratinhos alimentados com 6 tipos de rações de concentrações crescentes de sardinha com e sem tomate. É apresentado também o nível de significância dos factores óleo e tomate e a sua interligação para um $p < 0,05$. (^{a b c} - significativamente diferente $p < 0,05$ dentro de cada factor, óleo ou tomate). ONE-WAY ANOVA e teste Tukey Post Hoc para verificar o nível de significância entre os grupos, dentro do mesmo factor. Two-Way ANOVA para verificar o nível significância do efeito óleo, licopeno e sua associação ($p < 0,05$) (Σ Polinsaturados: $\Sigma n-3$: 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-3; $\Sigma n-6$: 18:2n-6, 18:3n-6, , 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:5n-6; 16:3n-4, 18:3n-4, 20:3n-9 Σ Monoinsaturados : 16:1n-7+n-9, 16:1n-5, 17:1, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-11, 22:1n-9, 24:1n-9; Σ Saturados: 14:0, 14:0 ISObr, 15:0, Ante-ISO 16:0, 16:0, 17:0 ISObr, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0); n-3 Index = (DHA + EPA)

| | Óleo | | | Tomate | | | Two – way ANOVA | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------|--------|------------|
| Ácidos gordos (%) | S | F1 | F2 | SL | F1L | F2L | Óleo | Tomate | Interacção |
| 14:0 | 0,95 ^a ±0,13 | 1,44 ^b ±0,18 | 2,07 ^c ±0,35 | 0,81 ^a ±0,14 | 1,44 ^b ±0,30 | 2,13 ^c ±0,42 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 15:0 | 0,18 ^a ±0,02 | 0,21 ^{ab} ±0,02 | 0,24 ^a ±0,04 | 0,17 ^a ±0,02 | 0,22 ^b ±0,03 | 0,27 ^c ±0,05 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 16:0 AnteISO | 1,03 ^a ±0,33 | 1,15 ^a ±0,23 | 1,37 ^a ±0,48 | 1,17 ^a ±0,34 | 0,91 ^a ±0,49 | 1,21 ^a ±0,33 | n.s. | n.s. | n.s. |
| 16:0 | 18,79 ^a ±1,28 | 22,22 ^b ±0,82 | 25,80 ^c ±1,93 | 18,38 ^a ±0,82 | 21,50 ^b ±1,07 | 25,31 ^c ±2,49 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 17:0 | 0,22 ^a ±0,03 | 0,27 ^b ±0,02 | 0,31 ^c ±0,04 | 0,21 ^a ±0,09 | 0,27 ^{ab} ±0,10 | 0,33 ^b ±0,05 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 18:0 | 7,73 ^a ±1,83 | 7,71 ^a ±0,92 | 7,67 ^a ±1,34 | 8,23 ^a ±1,91 | 8,02 ^a ±1,85 | 7,66 ^a ±1,18 | n.s. | n.s. | n.s. |
| 20:0 | 0,04 ^a ±0,04 | 0,02 ^a ±0,04 | 0,03 ^a ±0,04 | 0,04 ^a ±0,04 | 0,05 ^a ±0,05 | 0,07 ^a ±0,05 | n.s. | 0,042 | n.s. |
| Σ Saturados | 29,02 ^a ±2,84 | 33,10 ^b ±1,29 | 37,57 ^c ±2,35 | 29,16±2,43 | 32,55 ^b ±1,71 | 37,16 ^c ±3,63 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 16:1n7 n9 | 2,71 ^a ±0,92 | 3,66 ^a ±0,98 | 6,31 ^b ±1,26 | 2,28 ^a ±0,94 | 3,30 ^a ±0,91 | 5,33 ^b ±1,28 | <0,001 | 0,048 | n.s. |
| 18:1 n9 | 17,20 ^a ±2,92 | 17,73 ^a ±1,88 | 16,38 ^a ±2,66 | 16,04 ^a ±2,88 | 15,74 ^a ±3,27 | 14,62 ^a ±1,79 | n.s. | 0,029 | n.s. |
| 18:1 n7 | 2,74 ^a ±0,18 | 2,84 ^{ab} ±0,13 | 3,04 ^b ±0,23 | 2,72 ^a ±0,21 | 2,59 ^a ±0,12 | 2,76 ^a ±0,43 | 0,047 | 0,008 | n.s. |
| 20:1 n9 | 0,07 ^a ±0,07 | 0,19 ^b ±0,11 | 0,33 ^c ±0,09 | 0,09 ^a ±0,05 | 0,27 ^b ±0,05 | 0,38 ^c ±0,06 | <0,001 | 0,028 | n.s. |
| 20:1 n7 | 0,16 ^a ±0,11 | 0,21 ^a ±0,13 | 0,18 ^a ±0,09 | 0,16 ^a ±0,07 | 0,22 ^a ±0,09 | 0,18 ^a ±0,09 | n.s. | n.s. | n.s. |
| Σ Monoinsaturados | 23,02 ^a ±3,42 | 24,64 ^a ±2,44 | 26,26 ^a ±3,49 | 21,43 ^a ±3,73 | 22,15 ^a ±4,23 | 23,32 ^a ±2,63 | n.s. | 0,019 | n.s. |
| 18:2n-6 LA | 31,17 ^c ±4,16 | 25,89 ^b ±2,24 | 13,59 ^a ±1,68 | 30,23 ^c ±3,22 | 26,85 ^b ±2,01 | 13,56 ^a ±1,85 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 18:3n-3 ALA | 1,53 ^b ±0,37 | 1,28 ^b ±0,23 | 0,91 ^a ±0,25 | 1,42 ^a ±0,64 | 1,35 ^a ±0,35 | 0,97 ^a ±0,27 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 20:4n-6 AA | 7,42 ^b ±2,44 | 3,63 ^a ±0,95 | 2,89 ^a ±0,77 | 7,06 ^b ±1,95 | 3,01 ^a ±1,73 | 2,68 ^a ±0,53 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 20:5n-3 EPA | 0,02 ^a ±0,04 | 0,86 ^b ±0,12 | 2,48 ^c ±0,29 | 0,03 ^a ±0,05 | 1,00 ^b ±0,13 | 2,40 ^c ±0,49 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 22:5n-3 DPAn-3 | 1,05 ^a ±0,39 | 1,21 ^a ±0,27 | 1,73 ^b ±0,45 | 1,17 ^a ±0,28 | 1,38 ^a ±0,26 | 1,78 ^b ±0,35 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 22:5n-6 DPAn-6 | 0,42 ^b ±0,14 | 0,00 ^a ±0,00 | 0,00 ^a ±0,00 | 0,25 ^b ±0,15 | 0,00 ^a ±0,00 | 0,00 ^a ±0,00 | <0,001 | 0,024 | n.s. |
| 22:6n-3 DHA | 4,01 ^a ±1,55 | 7,83 ^b ±1,99 | 12,29 ^c ±2,87 | 4,89 ^a ±2,08 | 8,85 ^b ±3,42 | 11,77 ^b ±2,30 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| Σ Polinsaturados | 46,76 ^c ±1,81 | 41,80 ^b ±1,88 | 35,60 ^a ±4,22 | 46,92 ^b ±2,50 | 44,46 ^b ±2,79 | 35,09 ^a ±4,47 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| $\Sigma n-3$ | 7,43 ^a ±1,84 | 12,01 ^b ±2,20 | 18,86 ^c ±3,42 | 8,50 ^a ±2,60 | 13,90 ^b ±3,57 | 18,43 ^c ±2,75 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| $\Sigma n-6$ | 39,10 ^c ±2,20 | 29,57 ^b ±1,84 | 16,56 ^a ±1,96 | 38,16 ^c ±2,05 | 29,98 ^b ±2,67 | 16,42 ^a ±2,15 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ | 0,19 ^a ±0,05 | 0,41 ^b ±0,09 | 1,15 ^c ±0,22 | 0,23 ^a ±0,07 | 0,47 ^b ±0,17 | 1,13 ^c ±0,14 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| n-3 Index | 4,03 ^a ±1,56 | 8,70 ^b ±2,07 | 14,78 ^c ±3,05 | 4,93 ^a ±2,11 | 9,86 ^b ±3,39 | 14,18 ^c ±2,50 | <0,001 | n.s. | n.s. |

3.5 Perfil de ácidos Gordos no Cérebro

O cérebro é constituído por mais de 10% de ácidos gordos (AG) de matéria seca (Calon & Cole, 2007), valor que se confirma com o total de AG de todos os grupos testados a ultrapassar os 100mg por grama de amostra liofilizada, como se verifica na Tabela 14. Estes AG encontram-se nos fosfolípidos de membranas celulares que, no cérebro, têm uma concentração elevada de DHA e AA (20:4n-6) (McCann & Ames, 2005).

Tabela 14 – Média do total de AG quantificados nos vários grupos, com respectivos desvios padrão.

| | Total AG (mg/g) | DV |
|------------|-----------------|-------|
| S | 122.5 | 7.85 |
| SL | 164.0 | 19.59 |
| F1 | 130.8 | 19.76 |
| F2 | 142.7 | 26.07 |
| F1L | 142.4 | 12.57 |
| F2L | 125.8 | 5.58 |

O DHA têm uma acumulação rápida durante o início de vida e o local preferencial da sua deposição é no córtex e retina (Youdim & Antonio Martin, 2000). É-lhe atribuído uma relação com as funções cognitivas do cérebro, no entanto falta esclarecer qual o mecanismo: se altera a permeabilidade da Barreira-Hematoencefálica, se aumenta a fluidez das membranas, se activa certas enzimas, se influencia o sinal neural ou os canais iónicos ou, ainda, se actua no controlo do factor de crescimento das células nervosas (Kitajka, Puskás, Ágnes Zvara, Barceló-Goblijn, Yeo, & Farkas, 2002).

O Perfil de ácidos gordos no tecido cerebral de ratos alimentados com diferentes níveis de concentração de óleos de sardinha na dieta com e sem tomate, está evidenciada na Tabela 19.

Verifica-se que o factor Óleo de Sardinha nas rações dos ratos influencia significativamente, $p < 0,05$, a deposição da maioria dos PUFA no cérebro como descrito também por Lim e Choi (2009).

As diferenças significativas, $p < 0,05$, no perfil de deposição dos SFA evidenciam-se no 16:0 e consequentemente no Σ SFA, entre o grupo F1 e o grupo controlo S.

No perfil de MUFA só há aumentos significativamente, $p < 0,05$, nos animais alimentados com a ração F2, 22% de sardinha.

A concentração do AA e do DPAn-6 (22:5n-6) teve um decréscimo significativo, $p < 0,05$, como verificado também por Lim e Choi (2009).

Nos AG n-3, o EPA (20:5n-3) sofre um aumento significativo ($p<0,05$) em todos os grupos, diferenciando-se do DHA que só no grupo F2 (dieta com 4,15mg DHA por grama – Tabela 6) é que evidencia alterações significativas ($p<0,05$) relativamente ao grupo controlo. S. Lim (Lim & Choi, 2009) obteve uma percentagem semelhante da deposição de DHA no cérebro, 13,9%, mas com o dobro de DHA na dieta: 8,8 mg/g. Resultados idênticos tiveram Srinivasarao, Vajreswari, Suryaprakash, Rupalatha e Narayanareddy (1997) em que com uma ração à base de óleo de mostarda, rico no AG 18:3 e sem DHA, com uma razão n-3/n-6 de 0,93, obteve valores de DHA para o cérebro de 12,9%, para o cerebelo 13,9% e 10,2% para o tronco cerebral. Estes resultados parecem sugerir um *plateau* na deposição do DHA no tecido cerebral, em que por maior que seja a suplementação em DHA ou nos seus precursores, não há uma deposição adicional proporcional. Este *plateau* encontra-se em consonância com os resultados apresentados por Calon e Cole (2007), o que apoia as afirmações de Farooqui (2009), sobre a deficiência de DHA nas fases de desenvolvimento cerebral condicionar as prestações futuras, e a sua presença na alimentação na fase de envelhecimento ser essencial na estabilização e optimização das funções cerebrais.

Na deposição de DPAn-3 parece haver um mecanismo de feedback negativo quando há introdução de DHA na dieta (Tabela 6). Pois, quando o DHA é introduzido na dieta os valores de DPAn-3 diminuem significativamente ($p<0,05$) nos grupos F1 e F1L. No entanto aumentam significativamente ($p<0,05$) quando a concentração de DPA duplica na dieta (grupo F2).

Como também descrito por outros autores (Lim & Choi, 2009), a suplementação na dieta com AG n-3 leva a uma diminuição das concentrações no cérebro de AG n-6 e consequentemente aumento dos AG n-3. Em ambos os somatório dos AGs n-6 e n-3, as diferenças entre o grupo S e F2 são significativas, $p<0,05$.

Estas alterações dos somatórios dos AG n-3 e n-6 alteram estatisticamente ($p<0,05$) a razão n-3/n-6 que aumenta nas rações F1 e F2. Contribuiu para este aumento de razão, a diminuição dos AGs n-6 nos grupos F1 e F2, como o AA (20:4n-6) e o DPA (22:5n-6) e o aumento de DHA e EPA no tecido cerebral.

O efeito do óleo de sardinha na deposição dos vários ácidos gordos no Cérebro foi significativo ($p<0,05$) na maioria dos AG como se pode verificar na Tabela 19. Valores de $p<0,001$ foram obtidos em todos os PUFA o que confirma que a suplementação na dieta com PUFA influencia a sua deposição no cérebro.

O efeito do factor tomate e a sua interacção com o óleo de sardinha, na incorporação de ácidos gordos no cérebro, é estatisticamente significativa, $p<0,001$, nos AGs 16:0, 20:4n-6 (AA), 22:5n-3 (DPAn-3) e 22:6n-3 (DHA) evidenciado na Tabela 19.

Verifica-se que quando o factor óleo de sardinha é conjugado com o factor tomate a deposição de MUFAs no cérebro é significativa ($p < 0,05$).

A razão $n-3/n-6$ é influenciada somente pelo factor óleo. No entanto os $\sum n-3$ e $\sum n-6$ são influenciados pelos 2 factores isolados e em conjunto (Tabela 19).

Através da análise de regressão, comparação da Tabela 16 com a Tabela 17, a introdução do factor tomate na dieta diminui a linearidade da deposição, para um nível estatisticamente significativo ($p < 0,05$), dos seguintes AG: 20:1n-9, 20:1n-7, 20:4n-6 (AA), 22:5n-3 (DPA); Só aumenta a linearidade no 22:6w3 (DHA) e no $\sum n-3$, como está descrito na Tabela 18.

As Razões de deposição (RD) do DHA e do EPA no cérebro (Tabela 15) têm um comportamento semelhante ao do músculo e eritrócitos já que o DHA sofre uma diminuição significativa, $p < 0,05$, da RD F2, e pelo contrário o EPA sofre um aumento significativo, $p < 0,05$, para a mesma RD F2.

A principal diferença está no valor da RD F2 do DHA que diminui, comparativamente com os outros tecidos, para mais de metade. Esta facto ajuda a defender a hipótese de que o tecido cerebral atinge um *plateau* que deve ser mantido, mas que dificilmente é ultrapassado por saturação dos tecidos.

Tabela 15 - Média das Razões de Deposição dos principais PUFA no cérebro com respectivos desvios padrão.
(* diferença significativa, $p < 0,05$ entre RD F1 e RD F2)

| Cérebro | | |
|-------------|-------------|-------------|
| Ácido Gordo | RD F1 | RD F2 |
| 18:2n-6 LA | 0,026*±0,00 | 0,03*±0,00 |
| 18:3n-3 ALA | 0,00 | 0,00 |
| 20:4n-6 AA | 48,27*±2,13 | 19,71*±0,22 |
| 20:5n-3 EPA | 0,02*±0,01 | 0,03*±0,00 |
| 22:6n-3 DHA | 3,06*±0,20 | 1,33*±0,04 |

Tabela 16 – Análise de regressão, linear ou quadrática, do factor óleo de sardinha na deposição de ácidos gordos no cérebro (Σ n-3: 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-3; Σ n-6: 18:2n-6, 18:3n-6, , 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:5n-6; 16:3n-4, 18:3n-4, 20:3n-9); n-3 index = (EPA+DHA).

| Ácidos gordos (%) | Óleo | | | Análise de Regressão | | | |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|--------|----------------|--------|
| | S | F1 | F2 | Linear | | Quadrática | |
| | | | | R ² | p | R ² | p |
| 14:0 | 0,12 ^a ±0,01 | 0,11 ^a ±0,00 | 0,12 ^a ±0,01 | 0 | 0,813 | 0,26 | 0,048 |
| 16:0 AntelISO | 2,14 ^a ±0,17 | 2,48 ^b ±0,09 | 2,19 ^a ±0,24 | 0,06 | 0,25 | 0,47 | 0,02 |
| 16:0 | 17,05 ^a ±0,87 | 18,52 ^b ±0,39 | 18,39 ^b ±0,60 | 0,46 | <0,001 | 0,55 | <0,001 |
| 18:0 | 19,32 ^a ±0,37 | 19,31 ^a ±0,20 | 19,32 ^a ±0,41 | 0 | 0,99 | 0 | 0,99 |
| 20:0 | 0,53 ^b ±0,07 | 0,42 ^a ±0,04 | 0,45 ^a ±0,07 | 0,33 | 0,004 | 0,47 | 0,002 |
| Σ Saturados | 39,86 ^a ±1,17 | 41,46 ^b ±0,57 | 41,26 ^b ±0,76 | 0,37 | 0,002 | 0,45 | 0,002 |
| 16:1n7 n9 | 0,47 ^a ±0,07 | 0,50 ^a ±0,05 | 0,58 ^b ±0,06 | 0,31 | 0,006 | 0,39 | 0,007 |
| 18:1 n9 | 17,02 ^a ±0,44 | 17,67 ^a ±0,74 | 18,70 ^b ±0,53 | 0,55 | <0,001 | 0,61 | <0,001 |
| 18:1 n7 | 3,46 ^a ±0,15 | 3,38 ^a ±1,13 | 3,56 ^a ±0,14 | 0,01 | 0,740 | 0,16 | 0,170 |
| 20:1 n9 | 1,99 ^b ±0,26 | 1,61 ^a ±0,07 | 1,59 ^a ±0,17 | 0,45 | <0,001 | 0,53 | 0,001 |
| 20:1 n7 | 0,58 ^b ±0,08 | 0,48 ^a ±0,28 | 0,51 ^{ab} ±0,05 | 0,21 | 0,030 | 0,39 | 0,007 |
| Σ Monoinsaturados | 23,70 ^a ±0,80 | 23,76 ^a ±0,83 | 25,09 ^b ±0,76 | 0,24 | 0,017 | 0,41 | 0,005 |
| 18:2n-6 LA | 0,91 ^b ±0,08 | 1,01 ^c ±0,06 | 0,61 ^a ±0,03 | 0,27 | 0,011 | 0,90 | <0,001 |
| 20:4n-6 AA | 10,49 ^c ±0,45 | 9,17 ^b ±0,41 | 8,08 ^a ±0,09 | 0,88 | <0,001 | 0,89 | <0,001 |
| 20:5n-3 EPA | 0 ^a | 0,08 ^b ±0,02 | 0,28 ^c ±0,03 | 0,79 | <0,001 | 0,97 | <0,001 |
| 22:5n-3 DPAn-3 | 0,76 ^c ±0,15 | 0,27 ^a ±0,04 | 0,60 ^b ±0,06 | 0,22 | 0,025 | 0,84 | <0,001 |
| 22:5n-6 DPAn-6 | 3,26 ^c ±0,31 | 2,18 ^b ±0,19 | 1,77 ^a ±0,06 | 0,90 | <0,001 | 0,91 | <0,001 |
| 22:6n-3 DHA | 12,91 ^a ±0,81 | 13,12 ^{ab} ±0,86 | 13,88 ^b ±0,41 | 0,20 | 0,033 | 0,26 | 0,046 |
| Σ Polinsaturados | 34,13 ^b ±1,27 | 32,28 ^a ±1,27 | 31,25 ^a ±0,74 | 0,56 | <0,001 | 0,56 | <0,001 |
| Σ n-3 | 19,26 ^a ±0,74 | 19,63 ^{ab} ±0,83 | 20,55 ^b ±0,63 | 0,30 | 0,006 | 0,37 | 0,10 |
| Σ n-6 | 14,83 ^c ±0,63 | 12,52 ^b ±0,59 | 10,58 ^a ±0,12 | 0,91 | <0,001 | 0,93 | <0,001 |
| Σ n-3/ Σ n-6 | 1,30 ^a ±0,04 | 1,57 ^b ±0,05 | 1,94 ^c ±0,05 | 0,89 | <0,001 | 0,97 | <0,001 |
| n-3 Index | 12,91 ^a ±0,81 | 13,19 ^a ±0,87 | 14,16 ^b ±0,43 | 0,53 | 0,010 | 0,61 | 0,011 |

Tabela 17 - - Análise de regressão, linear ou quadrática, do factor tomate na deposição de ácidos gordos no cérebro (Σ n-3: 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-3; Σ n-6: 18:2n-6, 18:3n-6, , 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:5n-6; 16:3n-4, 18:3n-4, 20:3n-9); n-3 index = (EPA+DHA).

| Ácidos gordos (%) | Tomate | | | Análise de Regressão | | | |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|--------|----------------|--------|
| | SL | F1L | F2L | Linear | | Quadrática | |
| | | | | R ² | p | R ² | p |
| 14:0 | 0,17 ^b ±0,03 | 0,12 ^a ±0,01 | 0,12 ^a ±0,01 | 0,57 | <0,001 | 0,59 | <0,001 |
| 16:0 AntelISO | 2,70 ^b ±0,41 | 2,60 ^{ab} ±0,18 | 2,35 ^a ±0,10 | 0,17 | 0,035 | 0,23 | 0,049 |
| 16:0 | 22,46 ^a ±1,62 | 18,97 ^b ±1,23 | 18,43 ^b ±0,66 | 0,69 | <0,001 | 0,70 | <0,001 |
| 18:0 | 19,10 ^a ±0,47 | 19,56 ^a ±0,65 | 19,50 ^a ±0,36 | 0,14 | 0,061 | 0,16 | 0,14 |
| 20:0 | 0,42 ^a ±0,08 | 0,44 ^a ±0,07 | 0,42 ^a ±0,03 | 0,0 | 0,781 | 0,0 | 0,651 |
| Σ Saturados | 45,47 ^b ±1,76 | 42,43 ^a ±1,56 | 41,37 ^a ±0,89 | 0,61 | <0,001 | 0,61 | <0,001 |
| 16:1n7 n9 | 0,60 ^b ±0,07 | 0,48 ^a ±0,08 | 0,55 ^{ab} ±0,04 | 0,21 | 0,018 | 0,42 | 0,002 |
| 18:1 n9 | 17,38 ^a ±0,83 | 18,76 ^b ±1,06 | 18,55 ^b ±0,30 | 0,34 | 0,002 | 0,39 | 0,003 |
| 18:1 n7 | 3,52 ^{ab} ±0,18 | 3,59 ^b ±0,20 | 3,38 ^a ±0,07 | 0,04 | 0,356 | 0,24 | 0,042 |
| 20:1 n9 | 1,53 ^a ±0,24 | 1,76 ^a ±0,35 | 1,57 ^a ±0,14 | 0,03 | 0,410 | 0,14 | 0,186 |
| 20:1 n7 | 0,47 ^a ±0,08 | 0,54 ^a ±0,10 | 0,46 ^a ±0,04 | 0,02 | 0,457 | 0,15 | 0,158 |
| Σ Monoinsaturados | 23,72 ^a ±1,32 | 25,26 ^b ±1,53 | 24,5 ^{ab} ±0,47 | 0,14 | 0,056 | 0,24 | 0,045 |
| 18:2n-6 LA | 1,00 ^b ±0,04 | 0,89 ^b ±0,34 | 0,63 ^a ±0,04 | 0,29 | 0,004 | 0,39 | 0,004 |
| 20:4n-6 AA | 8,90 ^a ±0,84 | 8,63 ^a ±0,61 | 8,31 ^a ±0,18 | 0,13 | 0,073 | 0,14 | 0,169 |
| 20:5n-3 EPA | 0 ^a | 0,08 ^b ±0,02 | 0,27 ^c ±0,02 | 0,72 | <0,001 | 0,98 | 0,001 |
| 22:5n-3 DPAn-3 | 0,50 ^b ±0,14 | 0,27 ^a ±0,09 | 0,50 ^b ±0,03 | 0,06 | 0,238 | 0,59 | <0,001 |
| 22:5n-6 DPAn-6 | 2,33 ^b ±0,34 | 1,98 ^a ±0,21 | 1,76 ^a ±0,17 | 0,48 | <0,001 | 0,49 | <0,001 |
| 22:6n-3 DHA | 9,75 ^a ±1,29 | 11,26 ^b ±1,25 | 13,73 ^c ±0,58 | 0,59 | <0,001 | 0,71 | <0,001 |
| Σ Polinsaturados | 28,61 ^a ±2,23 | 29,72 ^{ab} ±1,85 | 31,64 ^b ±0,76 | 0,29 | 0,004 | 0,36 | 0,006 |
| Σ n-3 | 15,96 ^a ±1,22 | 17,86 ^b ±1,16 | 20,76 ^c ±0,57 | 0,67 | <0,001 | 0,80 | <0,001 |
| Σ n-6 | 12,40 ^b ±1,17 | 11,72 ^{ab} ±0,81 | 10,82 ^a ±0,33 | 0,34 | 0,002 | 0,39 | 0,004 |
| Σ n-3/ Σ n-6 | 1,29 ^a ±0,09 | 1,53 ^b ±0,07 | 1,92 ^c ±0,06 | 0,77 | <0,001 | 0,93 | <0,001 |
| n-3 Index | 9,75 ^a ±1,29 | 11,33 ^b ±1,25 | 14,01 ^c ±0,56 | 0,78 | <0,001 | 0,86 | <0,001 |

Tabela 18 – Resumo dos valores p das análises de regressão dos dois factores óleo sardinha e tomate no cérebro

| Ácidos gordos (%) | Análise Regressão | | | |
|-------------------|-------------------|------------|--------|------------|
| | Óleo Sardinha | | Tomate | |
| | Linear | Quadrática | Linear | Quadrática |
| 14:0 | 0,813 | 0,048 | <0,001 | <0,001 |
| 16:0 AntelSO | 0,25 | 0,02 | 0,035 | 0,049 |
| 16:0 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| 18:0 | 0,99 | 0,99 | 0,061 | 0,14 |
| 20:0 | 0,004 | 0,002 | 0,781 | 0,651 |
| Σ Saturados | 0,002 | 0,002 | <0,001 | <0,001 |
| 16:1n7 n9 | 0,006 | 0,007 | 0,018 | 0,002 |
| 18:1 n9 | <0,001 | <0,001 | 0,002 | 0,003 |
| 18:1 n7 | 0,740 | 0,170 | 0,356 | 0,042 |
| 20:1 n9 | <0,001 | 0,001 | 0,410 | 0,186 |
| 20:1 n7 | 0,030 | 0,007 | 0,457 | 0,158 |
| Σ Monoinsaturados | 0,017 | 0,005 | 0,056 | 0,045 |
| 18:2n-6 LA | 0,011 | <0,001 | 0,004 | 0,004 |
| 20:4n-6 AA | <0,001 | <0,001 | 0,073 | 0,169 |
| 20:5n-3 EPA | <0,001 | <0,001 | <0,001 | 0,001 |
| 22:5n-3 DPAn-3 | 0,025 | <0,001 | 0,238 | <0,001 |
| 22:5n-6 DPAn-6 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| 22:6n-3 DHA | 0,033 | 0,046 | <0,001 | <0,001 |
| Σ Polinsaturados | <0,001 | <0,001 | 0,004 | 0,006 |
| Σ n-3 | 0,006 | 0,10 | <0,001 | <0,001 |
| Σ n-6 | <0,001 | <0,001 | 0,002 | 0,004 |
| Σ n-3/Σ n-6 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| n-3 Index | 0,53 | 0,010 | <0,001 | <0,001 |

Tabela 19 - Disposição da percentagem dos Ácidos Gordos no Cérebro de ratinhos alimentados com 6 tipos de rações de concentrações crescentes de sardinha (óleo de sardinha) com e sem Tomate. É apresentado também o nível de significância dos factores óleo e Tomate e a sua interligação para um $p < 0,05$. (^{a b c} - significativamente diferente $p < 0,05$ dentro de cada factor, óleo ou Tomate). Testagem de hipótese com ONE-WAY ANOVA e teste Tukey Post Hoc para verificar o nível de significância entre os grupos. Testagem Two-Way ANOVA para verificar nível significância do efeito óleo, licopeno e sua associação ($p < 0,05$) (Σ Polinsaturados: $\Sigma n-3$: 16:3n-3, 16:4n-3, 18:3n-3, 18:4n-3, 20:3n-3, 20:4n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:5n-3; $\Sigma n-6$: 18:2n-6, 18:3n-6, , 20:2n-6, 20:4n-6, 22:2n-6, 22:5n-6; 16:3n-4, 18:3n-4, 20:3n-9 Σ Monoinsaturados : 16:1n-7+n-9, 16:1n-5, 17:1, 18:1n-9, 18:1n-7, 20:1n-9, 22:1n-11, 22:1n-9, 24:1n-9; Σ Saturados: 14:0, 14:0 ISObr, 15:0, Ante-ISO 16:0, 16:0, 17:0 ISObr, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0, 24:0); n-3 Index = (DHA + EPA)

| Ácidos gordos (%) | Óleo | | | Tomate | | | Two – way ANOVA | | |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------|----------|------------|
| | S | F1 | F2 | SL | F1L | F2L | Óleo | Licopeno | Interacção |
| 14:0 | 0,12 ^a ±0,01 | 0,11 ^a ±0,00 | 0,12 ^a ±0,01 | 0,17 ^b ±0,03 | 0,12 ^a ±0,01 | 0,12 ^a ±0,01 | <0,001 | 0,001 | <0,001 |
| 16:0 AnteISO | 2,14 ^a ±0,17 | 2,48 ^b ±0,09 | 2,19 ^a ±0,24 | 2,70 ^b ±0,41 | 2,60 ^{ab} ±0,18 | 2,35 ^a ±0,10 | 0,01 | <0,001 | 0,017 |
| 16:0 | 17,05 ^a ±0,87 | 18,52 ^b ±0,39 | 18,39 ^b ±0,60 | 22,46 ^a ±1,62 | 18,97 ^b ±1,23 | 18,43 ^b ±0,66 | 0,001 | <0,001 | <0,001 |
| 18:0 | 19,32 ^a ±0,37 | 19,31 ^a ±0,20 | 19,32 ^a ±0,41 | 19,10 ^a ±0,47 | 19,56 ^a ±0,65 | 19,50 ^a ±0,36 | n.s. | n.s. | n.s. |
| 20:0 | 0,53 ^b ±0,07 | 0,42 ^a ±0,04 | 0,45 ^a ±0,07 | 0,42 ^a ±0,08 | 0,44 ^a ±0,07 | 0,42 ^a ±0,03 | n.s. | 0,028 | 0,009 |
| Σ Saturados | 39,86 ^a ±1,17 | 41,46 ^b ±0,57 | 41,26 ^b ±0,76 | 45,47 ^b ±1,76 | 42,43 ^a ±1,56 | 41,37 ^a ±0,89 | 0,013 | <0,001 | <0,001 |
| 16:1n7 n9 | 0,47 ^a ±0,07 | 0,50 ^a ±0,05 | 0,58 ^b ±0,06 | 0,60 ^b ±0,07 | 0,48 ^a ±0,08 | 0,55 ^{ab} ±0,04 | 0,006 | n.s. | 0,001 |
| 18:1 n9 | 17,02 ^a ±0,44 | 17,67 ^a ±0,74 | 18,70 ^b ±0,53 | 17,38 ^a ±0,83 | 18,76 ^b ±1,06 | 18,55 ^b ±0,30 | <0,001 | 0,042 | 0,059 |
| 18:1 n7 | 3,46 ^a ±0,15 | 3,38 ^a ±1,13 | 3,56 ^a ±0,14 | 3,52 ^{ab} ±0,18 | 3,59 ^b ±0,20 | 3,38 ^a ±0,07 | n.s. | n.s. | 0,009 |
| 20:1 n9 | 1,99 ^b ±0,26 | 1,61 ^a ±0,07 | 1,59 ^a ±0,17 | 1,53 ^a ±0,24 | 1,76 ^a ±0,35 | 1,57 ^a ±0,14 | n.s. | n.s. | 0,001 |
| 20:1 n7 | 0,58 ^b ±0,08 | 0,48 ^a ±0,28 | 0,51 ^{ab} ±0,05 | 0,47 ^a ±0,08 | 0,54 ^a ±0,10 | 0,46 ^a ±0,04 | n.s. | n.s. | 0,004 |
| Σ Monoinsaturados | 23,70 ^a ±0,80 | 23,76 ^a ±0,83 | 25,09 ^b ±0,76 | 23,72 ^a ±1,32 | 25,26 ^b ±1,53 | 24,5 ^{ab} ±0,47 | 0,011 | n.s. | 0,026 |
| 18:2n-6 LA | 0,91 ^b ±0,08 | 1,01 ^c ±0,06 | 0,61 ^a ±0,03 | 1,00 ^b ±0,04 | 0,89 ^b ±0,34 | 0,63 ^a ±0,04 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 20:4n-6 AA | 10,49 ^c ±0,45 | 9,17 ^b ±0,41 | 8,08 ^a ±0,09 | 8,90 ^a ±0,84 | 8,63 ^a ±0,61 | 8,31 ^a ±0,18 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| 20:5n-3 EPA | 0 ^a | 0,08 ^b ±0,02 | 0,28 ^c ±0,03 | 0 ^a | 0,08 ^b ±0,02 | 0,27 ^c ±0,02 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| 22:5n-3 | 0,76 ^c ±0,15 | 0,27 ^a ±0,04 | 0,60 ^b ±0,06 | 0,50 ^b ±0,14 | 0,27 ^a ±0,09 | 0,50 ^b ±0,03 | <0,001 | 0,002 | 0,003 |
| 22:5n-6 | 3,26 ^c ±0,31 | 2,18 ^b ±0,19 | 1,77 ^a ±0,06 | 2,33 ^b ±0,34 | 1,98 ^a ±0,21 | 1,76 ^a ±0,17 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| 22:6n-3 DHA | 12,91 ^a ±0,81 | 13,12 ^{ab} ±0,86 | 13,88 ^b ±0,41 | 9,75 ^a ±1,29 | 11,26 ^b ±1,25 | 13,73 ^c ±0,58 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Σ Polinsaturados | 34,13 ^b ±1,27 | 32,28 ^a ±1,27 | 31,25 ^a ±0,74 | 28,61 ^a ±2,23 | 29,72 ^{ab} ±1,85 | 31,64 ^b ±0,76 | n.s. | <0,001 | <0,001 |
| $\Sigma n-3$ | 19,26 ^a ±0,74 | 19,63 ^{ab} ±0,83 | 20,55 ^b ±0,63 | 15,96 ^a ±1,22 | 17,86 ^b ±1,16 | 20,76 ^c ±0,57 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| $\Sigma n-6$ | 14,83 ^c ±0,63 | 12,52 ^b ±0,59 | 10,58 ^a ±0,12 | 12,40 ^b ±1,17 | 11,72 ^{ab} ±0,81 | 10,82 ^a ±0,33 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| $\Sigma n-3/\Sigma n-6$ | 1,30 ^a ±0,04 | 1,57 ^b ±0,05 | 1,94 ^c ±0,05 | 1,29 ^a ±0,09 | 1,53 ^b ±0,07 | 1,92 ^c ±0,06 | <0,001 | n.s. | n.s. |
| n-3 Index | 12,91 ^a ±0,81 | 13,19 ^a ±0,87 | 14,16 ^b ±0,43 | 9,75 ^a ±1,29 | 11,33 ^b ±1,25 | 14,01 ^c ±0,56 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

4 – Conclusão

As concentrações crescentes de óleo de sardinha levam a alterações crescentes da razão n-3/n-6 dos 3 tecidos, em que os ácidos gordos n-6 foram substituídos pelos n-3.

A redução do nível dos ácidos gordos n-6 nos tecidos pode ser conseguida à custa do aumento do teor dos ácidos gordos n-3 na dieta alimentar.

Os eritrócitos e o tecido muscular têm igual comportamento face à incorporação de n-3. A incorporação de DHA no cérebro só é alterada com concentrações de 22% de sardinha.

O cérebro quando exposto a altas concentrações de DHA na dieta, ao contrário do músculo e eritrócitos sugere um *plateau* nos 13% do total de ácidos gordos no tecido.

O tomate só interfere na incorporação de ácidos gordos no cérebro, o que sugere que algum dos seus componentes intervém na incorporação de AG neste órgão, possivelmente o licopeno.

A incorporação de EPA no cérebro, contrariamente à de DHA, é apenas dependente da quantidade de sardinha na dieta.

Uma lata de conserva de sardinha por dia confere um nível intermédio de protecção cardiovascular, e duas conferem o nível de protecção desejável.

A ingestão moderada de sardinha em conserva altera da razão n-3/n-6 em todos os tecidos, logo pode haver benefícios para a saúde a nível cardiovascular e cerebral.

O cálculo das RD dos 3 tecidos sugere que, para dietas com teor máximo de DHA 10% e EPA 8,5%, o aumento da razão n-3/n-6, deva ser conseguida através do incremento do nível de EPA, em detrimento do DHA.

Bibliografia

Agriculture and Agri-Food Canada. (2009). *What are Functional Foods and Nutraceuticals?* Consultado em 27 de 11 de 2009, de Agriculture and Agri-Food Canada: <http://www4.agr.gc.ca/AAFC-AAC/display-afficher.do?id=1171305207040&lang=eng#s2>

Alfaia, C. M., Quaresma, M. A., Castro, M. L., Martins, S. I., Portugal, A. P., Fontes, C. M. (2009). Fatty acid composition, including isomeric profile of conjugated linoleic acid, and cholesterol in Mertolenga-PDO beef. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 86 :2196–2205.

Bahuaud, D., Østbye, T.-K., Torstensen, B., Rørå, M., Ofstad, R., Veiseth, E. (2009). Atlantic salmon (*salmo salar*) muscle structure integrity and lysosomal cathepsins B and L influenced by dietary n-6 and n-3 fatty acids. *Food Chemistry* 114 , 1421-1432.

Bandarra, N. M. (1998). Óleos de Peixe: extracção, caracterização, estabilização e aspectos nutricionais da sua utilização. *Tese de Doutoramento em Biotecnologia apresentada no Instituto Superior Técnico - Universidade Técnica de Lisboa*.

Bandarra, N. M., Barata, J. D., Batista, I., Nunes, M. L., Bruges, M., Nascimento, C., et al. (1997). Influence of sardine oil supplements on fatty acid profile and cholesterol levels in the rat. *Elsevier Science* , 609-619.

Bandarra, N. M., Calhau, M. A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M., Bártoło, H., et al. (2009). *Composição e Valor Nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal*. Lisboa: IPIMAR; INSA; FCT.

Bandarra, N. M., Monteiro, M., Martínez, J. A., Kiely, M., & Thorsdottir, I. (2007). Erythrocyte Membrane Fatty Acid Incorporation as a Marker of Fish Diet in Young Overweight Europeans. *Journal of Aquatic Food Product Technology* , 16.

Bandarra, N. M., Palma, P., Batista, I., Nunes, M. L., Morais, G., Bruges, M., et al. (2002). Effect of a Supplemented Diet with Canned Sardine on the Lipid Fraction of Human Plasma and Erythrocytes. *Journal of Aquatic Food Product Technology* , 11, 177-185.

Belsey, J. D. (2008). w-3 Fatty Acids and the risk of coronary Heart Disease. In F. D. Meester, & R. R. Watson, *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention - The Columbus concept* (pp. 55-74). New Jersey: Humana Press Inc.

Berdanier, C. D. (2008). Fatty Acids and membrane function. In C. K. Chow, *Fatty Acid in Foods and their health implications*, 693-709. CRC Press.

- Best, B. (1990). *BEN BEST*. Obtido em 28 de 07 de 2009, de Fats You Need -- Essential Fatty Acids: <http://www.benbest.com/health/essfat.html>
- Bhuvaneswari, V., & Nagini, S. (2005). Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Curr Med Chem Anti-Can Agents* , 6: 627-635.
- Bruno, R. S., & Wildman, R. E. (2001). 10. Lycopene: Source, properties and Nutraceutical Potencial. In R. E. Wildman, *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Boca Raton: CRC Press.
- Calon, F., & Cole, G. (2007). Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: evidence from animal studies. *Elsevier* , 287-293.
- Camilo, M. d. (2009). Perspectiva Legal e Regulamentar dos suplementos alimentares. *Segurança e Qualidade Alimentar* , 6-10.
- Cohen, Z., Shak, A. V., & Richmond, A. (1988). Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum* correlation to growth rate. *J. Phycol* , 24, 328-332.
- Cunningham, J. G. (1999). Secção IV - Fisiologia gastrointestinal e metabolismo. In J. G. Cunningham, *Tratado de fisiologia veterinária* (Segunda Edição ed., pp. 213-308). Philadelphia: Editora Guanabara Koogans S.A.
- Decreto-Lei 227/99 de 22 de Junho. (22 de 06 de 1999). *Diário da República N° 146/99 - I Série - A* , 3585-3588. Lisboa.
- Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 de Junho. (28 de 06 de 2003). *Diário da República N° 143 - I SÉRIE-A* , 3724-3728. Lisboa.
- DiMascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophy* , 274: 532-538.
- Dubnov-Raz, G., & Berry, E. M. (2008). High w6-w3 fatty acid ratio. In F. D. Meester, & R. R. Watson, *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention* (pp. 29-34). New Jersey: Humana Press Inc.
- E. Tvrzická, M. V. (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection - quantitative aspects. *Elsevier* , 337-350.
- Farooqui, A. A. (2009). *Beneficial Effects of Fish Oil on Human Brain*. Columbus: Springer.
- Francis, F. J. *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology* (Second Edition ed.).

- FUFOSE. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe. *British Journal of Nutrition* , 81, S1-S27.
- Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Res* , 31, 261-272.
- Hamazaki, T. (2006). Aggression, fish oil, and Noradrenergic Activity. In S. Yehuda, & D. I. Motofsky, *nutrients, Stress, and Medical Disorders*, 245-252. New Jersey: Humana Press, Inc.
- Hames, D., & Hooper, N. (2005). *Biochemistry* (3ª Edição ed.). New York: Taylor & Francis Group.
- Harris, W. S., & Schacky, C. v. (2007). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: A case for omega-3 index as a new risk factor. *Pharmacological Research* , 55, 217-223.
- Harwood, J. (2007). Lipid Metabolism. In F. D. Gunstone, J. L. Harwood, & A. J. Dijkstra, *The Lipid Handbook* (pp. 637-702). Boca Raton: CRC Press.
- Hogg, N. (1998). Free radicals in disease. *Seminars Reprod Endocrin* , 16, 241-248.
- Horrocks, L., & Farooqui, A. A. (2004). Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* , 70, 361-372.
- Huang, C. L., & Sumpio, B. E. (2008). Olive Oil, the Mediterranean Diet, and cardiovascular health. *Elsevier* , 207, 407-415.
- IFIC, I. F. (2007). *Consumer Attitudes toward functional foods/foods for health*. Washigton: IFIC.
- ISSFAL. (2007). *Global recommendations*. Obtido em 03 de 11 de 2009, de ISSFAL - fatty acids, lipids and health studies: <http://www.issfal.org.uk/index.php/lipid-matters-mainmenu-8/recommendations-of-others-mainmenu-31>
- ISSFAL. (2007). *ISSFAL - fatty acids, lipids and health studies - Statement 3 PUFA in Adults*. Obtido em 25 de Março de 2009, de <http://www.issfal.org.uk/lipid-matters/issfal-policy-statements/statement-3-pufa-in-adults-10.html>
- ISSFAL. (2009). *ISSFAL - Official Statement Number 5*. Obtido em 29 de 10 de 2009, de <http://www.issfal.org.uk/index.php/lipid-matters-mainmenu-211>
- Khachih, F., Beecher, G. R., & Smith, J. C. (1995). Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J. Cell Biochem* , 22: 236-246.

- Kitajka, K., Puskás, L. G., Ágnes Zvara, L. H., Barceló-Goblijn, G., Yeo, Y. K., & Farkas, T. (2002). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: Modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *PNAS*, 99, 2619-2624.
- Kitts, D. (2001). Nutritional Toxicology. In Y. H. Hui, D. Kitts, & P. S. Stanfield, *FoodBorne Disease Handbook*, 379-446. New York: Marcel Dekker.
- Klurfeld, D. M. (2008). Dietary Fats, Eicosanoides, and the Immune System. In C. C. Akoh, & D. B. Min, *Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 539-549. CRC Press.
- Koletzko¹, B., Bindels, P. J., Bung, P., Ferre, P., Gil, A., Lentze, M. J., et al. (1998). Growth, development and differentiation: a functional food science approach. *British Journal of Nutrition*, 80, S5-S45.
- Koolman, J., & Roehm, K. H. (2005). *Color Atlas of Biochemistry* (2ª Edição ed.). New York: Thieme.
- Kristensen, S. D., Iversen, A. M., & Schmidt, E. B. (2001). n-3 polyunsaturated fatty acids and coronaru thrombosis. *Lipids*, S79-S82.
- Lee, J. Y., & Hwang, D. H. (2008). Dietary Fatty Acids and Eicosanoids. In C. K. Chow, *Fatty Acids in foods and their health implications*, 713-724. CRC Press.
- Lepage, G., & Roy, C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J. Lipid Res*, 27, 114-119.
- Lim, S.-Y., & Choi, H.-J. (2009). Effect of Intake of Dried Mackerel on Brain Fatty Acid Composition and passive avoidance performance. *The Open Nutraceuticals Journal*, 2, 4-8.
- Lycocard. (s.d.). *Lycopene and human Health*. Obtido em 01 de 12 de 2009, de Lycocard: http://www.lycocard.com/index.php/lyco_pub/health/
- McCann, J. C., & Ames, B. N. (2005). In Docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required fo development of normal brain function? An overview of evidence fron cognitive and behavioral tests in humans anda animals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 281-295.
- Moher, D. (2005). *Effects of omega-3 fatty acids on child and maternal health*. Rockville: Agency for Healthcare Reserarch and Quality.
- Molina, M. J. (2002). *O Cérebro Humano e os computadores*. Obtido em 15 de 09 de 2009, de MOLWICKPEDIA: <http://www.molwick.com/pt/cerebro/515-cerebro-humano.html#texto>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry* (Third Edition ed.). United States of America: Worth Publishers.

Olia, A. S. (Julho de 2008). Role of lycopene and long chain n-3 Polynsaturated fatty acid supplements in airway inflammation. New South Wales, Australia: School of Biomedical Sciences - University of Newcastle.

Olmedilla, A., Granado, L. B., Gil, M. E., Blasco, N. I., & Rojas, H. I. (1997). Serum status of carotenoids in control subjects and its relation to the diet. *Nutr Hosp* , 12: 245-249.

Paulo, M. d. (2005). Efeito dos Ácidos Gordos w3 no síndrome metabólico associado à doença cardiovascular - Relatório de Estágio Curricular. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

Pérez-López, F. R., Chedraui, P., Haya, J., & Cuadros, J. L. (2009). Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* .

R. Dickey, N. M. (s.d.). Redesigning beef cattle to have a more healthful fatty acid composition. *Nutritional Physiology-Department of Animal Science* ,

Ramamurthy, S., Mir, F., Gould, R. M., & Breton, G. C. (2006). Characterization of thromboxane A2 receptor signaling in developing rat oligodendrocytes: nuclear receptor localization and stimulation of myelin basic protein expression. *J. Neurosc. Res.* , 84, 1402-1414.

Ramirez. (2009). *Sardinhas em óleo vegetal*. Obtido em 01 de 12 de 2009, de Ramirez: <http://www.ramirez.pt/?cat=2&subcat=4&cod=13>

Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (2001). 7 - Cytokines and cytokine receptors. In I. Roitt, J. Brostoff, & D. Male, *Immunology* (pp. 119-129). Mosby International Ltd.

Russo, G. L. (2009). Dietary n-6 and n-3 polynsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology* , 77: 937-946.

Simopoulos, A. P. (2009). SYMPOSIUM: ROLE OF POULTRY PRODUCTS IN ENRICHING THE HUMAN DIET WITH N-3 PUFA. *Human Requirement for N-3 Polyunsaturated Fatty Acids* (p. 10). Washington: The Center for Genetics Nutrition and Health,.

Srinivasarao, P., Vajreswari, A., Suryaprakash, P., Rupalatha, & Narayanareddy, K. (1997). Lipid composition and fatty acid profiles of myelin and synaptosomal membranes of rat brain in response to the consumption of different fats. *Nutritional Biochemistry* , 8, 527-534.

Surai, P. F., Benadé, A. J., & Speake, B. K. (2008). Natural Antioxidants in Land and Marine Based Wild Type food - Risk reduction. In F. d. Meester, & R. R. Watson, *Wild-Type Food in Health Promotion and Disease Prevention - The columbus concept*, 357-375. New Jersey: Humana Press Inc.

Suzuki, H., Park, S. J., Tamura, M., & Ando, S. (1998). Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mechanisms of Ageing and Development*, 101, 119–128.

The George Mateljan Foundation. (2001-2009). *The World's healthiest foods - George Mateljan Foundation*. Obtido em 15 de 10 de 2009, de Sardines - In depth nutrient analysis: <http://www.whfoods.com/genpage.php?tname=nutrientprofile&dbid=174>

Vilela, A. L. (s.d.). *O Sistema Nervoso*. Obtido em 14 de 09 de 2009, de Anatomia & Fisiologia Humanas: <http://www.afh.bio.br/nervoso/nervoso3.asp>

Voet, D., & Voet, J. D. (1995). *Biochemistry* (Second Edition ed.). United States of America: John Wiley & Sons, Inc.

WebCiencia.com. (s.d.). *Cérebro*. Obtido em 14 de 09 de 2009, de WebCiencia.com - Ciência e Cultura na Web: http://www.webciencia.com/11_04cerebro.htm

WebCiencia.com. (s.d.). *Sistema Nervoso Central*. Obtido em 14 de 09 de 2009, de WebCiencia.com - Ciência e Cultura na Web: http://www.webciencia.com/11_29snc.htm

Whitney, E., & Rolfes, S. R. (2008). *Understanding Nutrition*. Belmont: Thomson Wadsworth.

Wikipedia. (2009). *Steroide*. Obtido em 31 de 10 de 2009, de Wikipedia Die Freie Enzyklopädie:

http://images.google.com/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7f/Steroide_Nomenklatur.svg/250px-Steroide_Nomenklatur.svg.png&imgrefurl=http://de.wikipedia.org/wiki/Steroide&usq=__9tOt5RwfoBB0AcGbrPivMC1ptc4=&h=191&w=250&sz=1

Wildman, R. E. (2001). *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Boca Raton: CRC Press.

Willcox, J. K., Catignani, G. L., & Lazarus, S. (2003). Tomatoes and Cardiovascular Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 1–18.

Youdim, K. A., & Antonio Martin, J. A. (2000). Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 383-399.

Zubay, G. L., Parson, W. W., & Vance, D. E. (1995). *Principles of Biochemistry*. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers.

ANEXOS

ANEXO 1 – Outliers

Na análise estatística foram removidos indivíduos que apresentavam valores “outliers extremos” em diferentes ácidos gordos. A sua determinação foi efectuada através da representação gráfica de caixas de bigodes, em que os outliers extremos são ilustrados com um “*” e representam valores 3 vezes superior aos da caixa. São também evidenciados os outliers severos pelo símbolo “o”.

1. Cérebro

Os ratos 1.47, 3.04, 4.12, 4.31 e 6.28 foram retirados da análise estatística por apresentarem valores outlier extremos em muitos dos ácidos gordos quantificados, o que condicionava os resultados, principalmente nos PUFA.

Para ilustrar os outliers apresentam-se alguns gráficos de caixa de bigodes:

Ilustração 18 – Representação gráfica, caixa de bigodes, de valores outliers extremos dos indivíduos 4.31 e 4.12 na quantificação dos Ácidos Gordos 22:6 n-3 (direita) e 22:5 n-6 no grupo F2

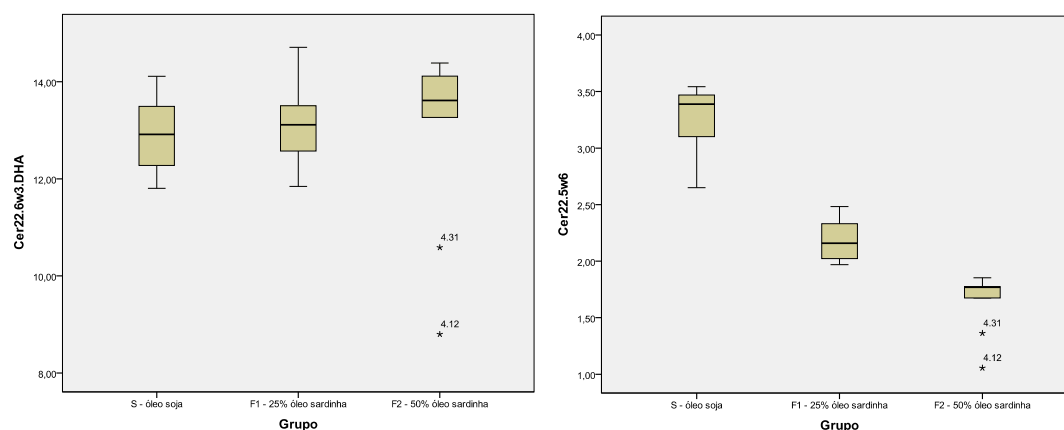


Ilustração 19 - Representação gráfica, caixa de bigodes, de valores outliers extremos dos indivíduos 1.47, 4.12 e 6.28 na quantificação do Ácido Gordo 20:6n-6 nos grupos S, F2 e F2L, respectivamente.

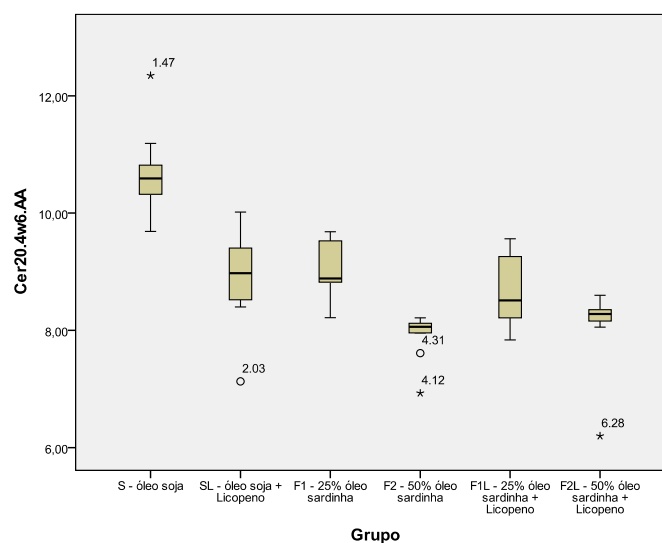


Ilustração 20 - Representação gráfica, caixa de bigodes, de valores outliers extremos dos indivíduos 1.47 e 6.28 na quantificação dos Ácidos Gordos 18:1n-9 nos grupos S e F2L, respectivamente.

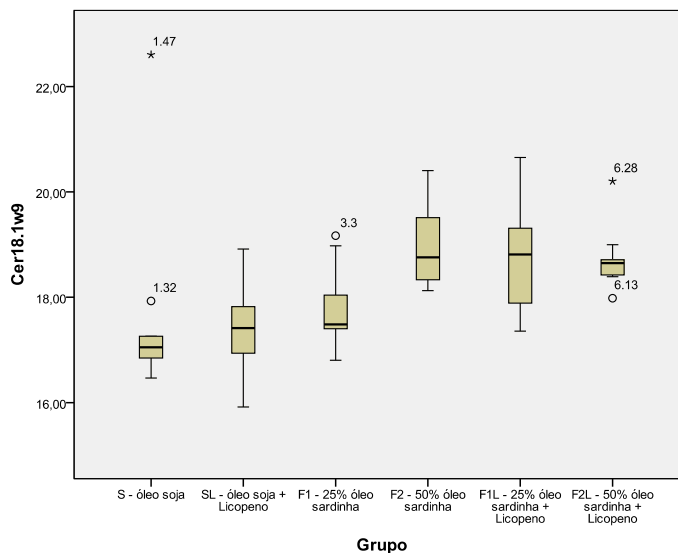


Ilustração 21 - Representação gráfica, caixa de bigodes, de valores outliers extremos dos indivíduos 1.47, 3.04 e 6.28 na quantificação do Ácido Gordo Ante ISSO 16:0 nos grupos S, F1 e F2L, respectivamente.

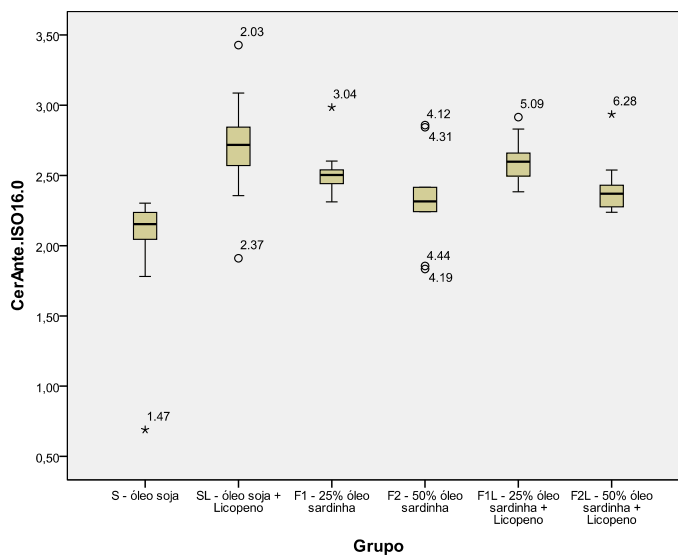
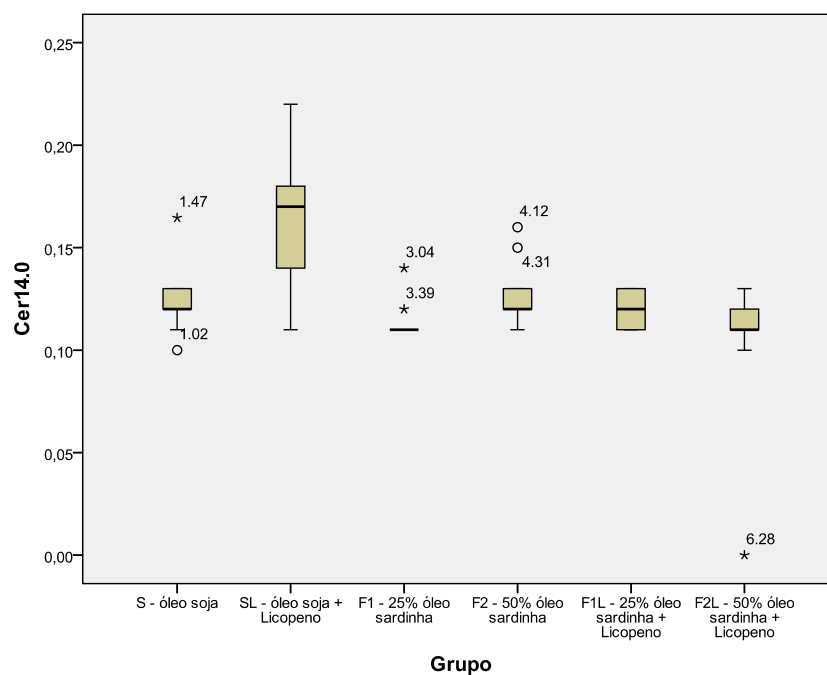


Ilustração 22 - Representação gráfica, caixa de bigodes, de valores outliers extremos dos indivíduos 1.47, 3.04, 3.39 e 6.28 na quantificação do Ácido Gordo 14:0 nos grupos S, F1 e F2L, respectivamente.



2. Músculo

O rato 6.11 foi retirado da análise estatística por apresentarem valores outlier extremos em muitos dos ácidos gordos quantificados.

Os seguintes gráficos de caixa de bigodes ilustram o outlier.

Ilustração 23 - Representação gráfica, caixa de bigodes, de valores outliers extremos do indivíduo 6.11 na quantificação dos Ácidos Gordos 15:0 e 16:0 nos grupo F2L. No gráfico do AG 16:0 também é visível que o indivíduo 1.17 é um outlier, respectivamente

